

**Correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex par recombinaison  
homologue avec la technologie CRISPR/Cas9**

**Mémoire**

LINDSAY GIRARD

**Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales de l'Université Laval offert en extension  
à l'Université du Québec à Chicoutimi**

Maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA SANTÉ  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
Chicoutimi, Canada

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
Québec, Canada

© Lindsay Girard, 2019

**Correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex par recombinaison  
homologue avec la technologie CRISPR/Cas9**

Mémoire

LINDSAY GIRARD

Sous la direction de :  
Catherine Laprise, Directrice de recherche

## RÉSUMÉ

L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) fait partie d'un regroupement de maladies héréditaires dont le tissu cible est la peau. Cette maladie dermatologique est causée par une mutation dans les gènes *KRT5* ou *KRT14*, laquelle entraîne un problème au niveau de la formation des filaments intermédiaires de la kératine qui composent la peau. Un mésappariement au niveau des kératines 5 et 14 est responsable de l'apparition des symptômes de la maladie incluant la formation de cloques suite au trauma mécanique que subit la peau. Ces cloques entraînent d'importantes douleurs chez le patient, et de l'inflammation et de l'irritation. Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible pour soulager les patients atteints de la maladie.

Depuis quelques années, les chercheurs utilisent des technologies pour modifier directement l'ADN des patients afin de réparer la mutation responsable de l'apparition des symptômes. Des technologies d'édition du génome telles que CRISPR/Cas9 constituent donc une avenue prometteuse pour le traitement de maladies héréditaires monogéniques comme l'EBS. Cette technologie permet de cibler un endroit précis dans le génome par la combinaison d'un ARN guide simple brin et d'une protéine Cas9. La réparation de l'ADN se fait par l'induction d'une coupure double brin de l'ADN par la protéine Cas9 et sa réparation par un fragment d'ADN donneur double ou simple brin.

Ce projet a pour objectif principal de corriger les mutations causant l'EBS chez deux patients possédant des mutations hétérozygotes. Plus spécifiquement, ce projet de maîtrise a pour objectif d'optimiser la méthode permettant l'utilisation de CRISPR/Cas9 dans un contexte d'EBS. La technologie CRISPR/Cas9 a été utilisée sur des cellules HEK293T, permettant de démontrer que la Cas9 est en mesure d'induire une coupure double brin de l'ADN au site ciblé dans l'ADN. Ensuite, il a été démontré que la coupure de la Cas9 jumelée à l'utilisation d'un ADN double ou simple brin permet de réparer la coupure en réalisant de la recombinaison homologe. Le séquençage a permis de confirmer ces résultats. À ce jour, les résultats dans les cellules HEK293T se sont montrés concluants et ont permis d'initier les travaux dans les fibroblastes de patients.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	x
REMERCIEMENTS .....	xiii
AVANT-PROPOS.....	xiv
INTRODUCTION .....	1
1. PEAU ET KÉRATINES .....	1
1.1. Fonctions de la peau .....	1
1.2. Structure de la peau .....	2
1.2.1. Épiderme.....	2
1.2.2. Derme .....	4
1.2.3. Hypoderme .....	4
1.3. Kératines.....	4
2. ÉPIDERMOLYSES BULLEUSES .....	8
2.1. Épidermolyse bulleuse dystrophique .....	9
2.2. Épidermolyse bulleuse jonctionnelle .....	9
2.3. Syndrome de Kindler .....	10
2.4. Épidermolyse bulleuse simplex.....	10
2.4.1. Épidermolyse bulleuse simplex localisée .....	13
2.4.2. Épidermolyse bulleuse simplex généralisée intermédiaire.....	13
2.4.3. Épidermolyse bulleuse simplex généralisée sévère.....	13
2.4.4. Autres phénotypes associés à l'EBS.....	14

2.5. Essais thérapeutiques.....	15
3. TECHNOLOGIES D'ÉDITION DU GÉNOME.....	19
3.1. Fonctionnement général des technologies d'édition du génome .....	20
3.2. Méganucléases .....	21
3.2.1. Historique .....	21
3.2.2. Mode de fonctionnement dans l'édition du génome .....	22
3.2.3. Applications de la technologie .....	22
3.3. Nucléases en doigts de zinc.....	23
3.3.1. Historique .....	23
3.3.2. Mode de fonctionnement dans l'édition du génome .....	23
3.3.3. Applications de la technologie .....	24
3.4. Transcription activator-like effector nucleases .....	25
3.4.1. Historique .....	25
3.4.2. Mode de fonctionnement dans l'édition du génome .....	26
3.4.3. Applications de la technologie .....	27
3.5. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9).....	29
3.5.1. Historique .....	29
3.5.2. Mode de fonctionnement .....	31
3.5.3. Applications de la technologie de CRISPR/Cas9.....	36
4. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	38
4.1. Contexte : Correction génétique avec CRISPR/Cas9 .....	38
4.2. Objectifs et hypothèses.....	40
CHAPITRE I: CRISPR/Cas9-homologous recombination strategy for the correction of Epidermolysis Bullosa Simplex mutations.....	41
Avant-propos .....	41

Résumé.....	44
Abstract.....	44
Introduction.....	45
Material and Methods .....	46
Results.....	49
Discussion.....	52
Figures .....	55
References.....	61
CHAPITRE II : DISCUSSION GÉNÉRALE .....	64
1. Retour sur les objectifs .....	64
1.1. Choix de la méthode d'édition du génome.....	65
1.2. Présence de recombinaison non-homologue .....	66
1.3. Recombinaison homologue en présence d'un ADN donneur .....	67
1.4. Utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 dans les fibroblastes primaires .....	69
2. Perspectives .....	70
3. Considérations éthiques .....	72
3.1. Bienfaits et risques de l'édition du génome .....	73
3.2. Législation en vigueur.....	74
3.3. Opinions dans le monde scientifique .....	75
CONCLUSION .....	77
BIBLIOGRAPHIE .....	78

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Localisation et protéines mutées des épidermolyses bulleuses selon les différentes couches de la peau .....	8
Tableau 2. Gènes mutés responsables de l'épidermolyse bulleuse simplex.....	11
Tableau 3. Mutations présentes chez les patients atteints d'épidermolyse bulleuse simplex .....	16

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la peau .....	2
Figure 2. Couches de l'épiderme .....	3
Figure 3. Formation des filaments intermédiaires de kératine .....	6
Figure 4. Structure générale des kératines de type I et II .....	6
Figure 5. Localisation des mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex sur les protéines K5 et K14.....	12
Figure 6. Gènes associés aux différents sous-types d'épidermolyse bulleuse simplex dans l'étude québécoise .....	17
Figure 7. Évolution des technologies d'édition de l'ADN .....	20
Figure 8. Principe de base de l'édition du génome.....	21
Figure 9. Mode de fonctionnement d'une méganucléase sur un double brin d'ADN.....	22
Figure 10. Mode de fonctionnement des nucléases en doigts de zinc .....	24
Figure 11. Représentation des protéines TALEs présentes dans les bactéries .....	26
Figure 12. Structure des TALEN induisant une coupure dans le double brin d'ADN.....	27
Figure 13. Fonctionnement de CRISPR/Cas9 au niveau des bactéries .....	30
Figure 14. Mode de fonctionnement de CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome .....	32
Figure 15. Mode de fonctionnement de la cytidine désaminase.....	33
Figure 16. Mode de fonctionnement des éditeurs d'adénosines.....	34
Figure 17. Mode de fonctionnement de la Cas13 .....	35
Figure 18. Représentation générale du projet menant à la correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex par CRISPR/Cas9 .....	39
Figure 19. <i>Sequences of the selected sgRNAs</i> .....	55
Figure 20. <i>Location of the selected sgRNAs and sequences</i> .....	55
Figure 21. <i>Scheme strategy used for CRISPR-mediated HDR for the c.449T&gt;C in KRT5</i> ..	56
Figure 22. <i>Sequences of ssDNAs</i> .....	57
Figure 23. <i>Surveyor assay of K14sgRNAs mediated cleavage in HEK293T cells</i> .....	57
Figure 24. <i>Analysis of INDELs in HEK293T cells using the TIDE web portal</i> .....	58
Figure 25. <i>Analysis of indels in primary fibroblasts using the TIDE web portal</i> .....	59
Figure 26. <i>Site-specific homologous recombination mediated by dsDNA</i> .....	60



Figure 27. <i>Site-specific homologous recombination mediated by ssDNA</i> .....	60
Figure 28. Contribution du projet de recherche pour la correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex par CRISPR/Cas9 .....	72

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
AD	Domaine d'activation acide
ADAR	Adénosine désaminase agissant sur l'ADN
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
ARN	Acide ribonucléique
ARNcr	ARN CRISPR
ARNcrtra	ARN CRISPR transactivateur
ARNgs	ARN guide simple brin
ARNm	ARN messenger
C	Cytosine
CAS9	Protéine couplée à CRISPR pour l'édition de l'ADN
CAS13	Protéine couplée à CRISPR pour l'édition de l'ARN
CDB	Cassure double brin de l'ADN
<i>CCR5</i>	Gène <i>Common cytokine receptor gamma chain</i>
<i>COL17A</i>	Gène codant pour le collagène alpha de type XVII
<i>COL7A1</i>	Gène codant pour le collagène alpha de type VII
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CSP <sub>h</sub>	Cellules souches pluripotentes humaines
CSP <sub>i</sub>	Cellules souches pluripotentes induites
dCas9	Protéine Cas9 dont le domaine catalytique est désactivé
dCas13	Protéine Cas13 dont le domaine catalytique est désactivé
EB	Épidermolyses bulleuses
EBD	Épidermolyse bulleuse dystrophique
EBDD	Épidermolyse bulleuse dystrophique dominante
EBDR	Épidermolyse bulleuse dystrophique récessive
EBJ	Épidermolyse bulleuse jonctionnelle

EBS	Épidermolyse bulleuse simplex
EBS-AP	Épidermolyse bulleuse simplex avec atrésie pylorique
EBS-DM	Épidermolyse bulleuse simplex avec dystrophie musculaire
EBS-GEN	Épidermolyse bulleuse simplex généralisée
EBS-GEN SEV	Épidermolyse bulleuse simplex généralisée sévère
EBS-LOC	Épidermolyse bulleuse simplex localisée
EBS-PM	Épidermolyse bulleuse simplex avec pigmentations mouchetées
<i>EXPH5</i>	Gène codant pour l'exophilin-5
FDA	Food and Drug Administration
<i>FERMT1</i>	Gène codant pour la kindilin-1
GFP	Protéine fluorescente verte, acronyme pour <i>green fluorescent protein</i>
G	Guanine
HEK293T	Cellules rénales embryonnaires humaines
<i>HTT</i>	Gène codant pour la huntingtin
I	Inosine
<i>ITGB4</i>	Gène codant pour la sous unité bêta 4 des intégrines
<i>ITGA6</i>	Gène codant pour la sous unité alpha 6 des intégrines
K5	Kératine 5
K14	Kératine 14
KIF	Filaments intermédiaires de kératine
<i>KLHL24</i>	Gène codant pour la <i>Kelch-Like Protein 24</i>
<i>KRT5</i>	Gène codant pour la kératine 5
<i>KRT14</i>	Gène codant pour la kératine 14
SK	Syndrome de Kindler
<i>LAMA3</i>	Gène codant pour la sous-unité alpha 3 de la laminine
<i>LAMB3</i>	Gène codant pour la sous-unité bêta 3 de la laminine
<i>LAMC2</i>	Gène codant pour la sous-unité gamma 2 de la laminine
RH	Recombinaison homologue
RNH	Recombinaison non-homologue
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PB	Paires de bases

PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
<i>PLEC</i>	Gène codant pour la plectine
R0	Répétition zéro
RVD	Répétitions variables de di-résidus
TALEs	Protéines transcriptrices activatrice-like
TALENS	Nucléases effectrices de type activateur de transcription
T	Thymine
TMAO	Triméthylamine N-oxyde
U	Uracile
UGI	Uracile N-glycosilase
ZFN	Nucléase en doigts de zinc
ZFP	Protéine de doigts de zinc

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier ma directrice de recherche, Catherine Laprise. Merci de m'avoir permis de travailler au laboratoire pendant la fin de mon baccalauréat. Sans cette expérience, je n'en serais probablement pas rendue à rédiger les remerciements de mon mémoire! Un grand merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir fait confiance pendant ces belles années à la maîtrise.

Merci également à Mbarka Bchetnia avec qui j'ai travaillé durant les quatre dernières années. Merci de m'avoir partagé tout ce que tu connais et surtout de m'avoir partagé ta passion pour ce merveilleux projet de recherche. J'ai adoré travailler en équipe avec toi et surtout nos conversations pleines d'abréviations que seules nous comprenions.

Merci également à tous les autres membres de l'équipe du laboratoire de la professeure Catherine Laprise. Merci d'avoir été présents pendant mon cheminement. Vous côtoyer m'aura permis d'en apprendre davantage sur d'autres pans de la recherche au laboratoire. Merci d'avoir été présents dans les bons comme dans les moins bons moments.

Merci aux organismes subventionnaires, dont la Fondation du grand Défi Pierre Lavoie pour l'obtention d'une bourse d'études supérieures et aux organismes subventionnaires ayant permis la réalisation de ce projet de recherche notamment la *Rare Disease Foundation* et Debra Canada. Un merci particulier à la famille Riverin pour le soutien initial de cette initiative de recherche sur l'épidermolyse bulleuse simplex. Peu de gens reconnaissent l'importance de la recherche et vous êtes un exemple en ce sens.

Finalement, merci à ma famille, mon conjoint et mes amis de m'avoir soutenue dans les dernières années. Vos encouragements ont contribué grandement à la poursuite de cette maîtrise. Votre support et votre compréhension ont pesé fort dans la balance. Merci aussi d'avoir été présents pour me changer les idées lorsque nécessaire. Je ne pourrais pas terminer sans un merci tout spécial à ma petite LilyChat qui a grandement contribué à ma détente quotidienne dans la rédaction de ce mémoire de maîtrise.

## AVANT-PROPOS

Le présent mémoire est divisé en trois parties. La première est l'introduction qui permet de mettre en place les éléments nécessaires pour la bonne compréhension de la suite du mémoire. Plus précisément, elle comprend une section sur la peau et les kératines pour bien comprendre sa structure et ses fonctions, de même que les gènes qui codent pour les différentes kératines. Ensuite, une section sur les épidermolyses bulleuses permet de bien mettre en contexte la maladie sur laquelle porte ce mémoire de maîtrise. Un troisième chapitre est dédié aux technologies d'édition du génome pour établir un bref historique des avancées dans le domaine, de même que les différentes techniques disponibles actuellement. La dernière section de l'introduction est un résumé du contexte global dans lequel le présent projet de maîtrise s'insère, de même que les objectifs du projet de recherche.

La seconde partie du mémoire constitue le corps du travail et se compose de deux chapitres. Le chapitre 1 est composé de l'article scientifique issu du projet de recherche réalisé dans le cadre de ce mémoire. L'article a été soumis dans la revue *Investigative Journal of Dermatology* le 16 mai 2019. La technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 a été utilisée dans des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293T) pour démontrer qu'il est possible d'utiliser la méthode dans un contexte d'épidermolyse bulleuse simple. Des manipulations sur des cellules HEK293T ont démontré que la protéine Cas9 induit la coupure dans le double d'ADN comme il se doit par la présence de recombinaison non-homologue. Il a été par la suite démontré que la réparation de la coupure par recombinaison homologue est présente autant lors de l'utilisation d'un ADN donneur double brin que simple brin. Le chapitre 2 présente une discussion plus élaborée en lien avec le projet de recherche présenté dans l'article. Il complète les éléments énoncés dans l'article en plus de présenter les avantages et les limites, mais surtout les perspectives du projet ou la suite logique des étapes franchies.

La quatrième et dernière partie de ce mémoire est consacrée à la conclusion qui permet de faire un retour sur le sujet du mémoire de même que sur les résultats présentés dans celui-ci.

# INTRODUCTION

## 1. PEAU ET KÉRATINES

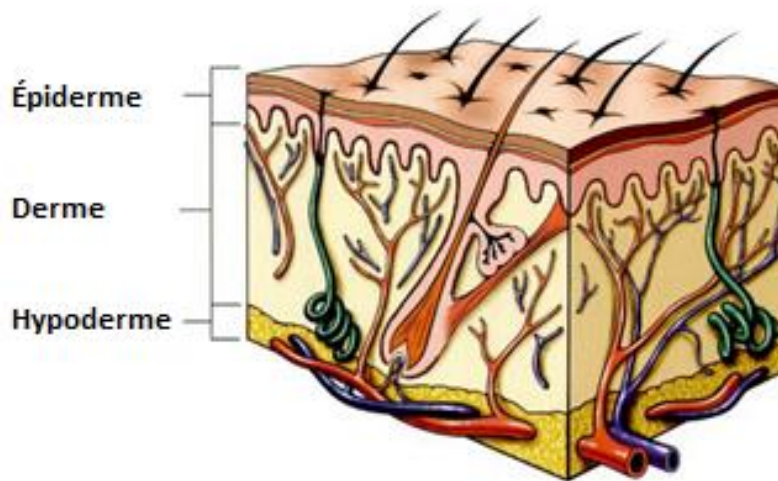
La peau est un organe du corps humain pouvant atteindre un poids entre 3 et 5 kilogrammes chez l'adulte.<sup>1</sup> Elle constitue un des plus grand organes du corps humain recouvrant une superficie entre 1,5 et 2 m<sup>2</sup>.<sup>1</sup> Son épaisseur diffère selon les différentes régions du corps.<sup>2</sup> Ainsi, la peau du dos et des bras est plus épaisse que celle des paupières puisque la peau n'a pas la même fonction dans ces contextes.<sup>1</sup> Elle occupe également plusieurs fonctions dans le corps et possède une structure particulière.<sup>3</sup>

### 1.1. Fonctions de la peau

La peau occupe diverses fonctions dans le corps humain. La **protection** est l'une d'entre elles. Elle sert de barrière physique contre les agressions mécaniques pouvant se produire. Elle protège également contre les invasions de pathogènes puisqu'elle constitue une barrière chimique.<sup>2</sup> Le système immunitaire, ainsi que divers composants humoraux, constituent la barrière immunologique de la peau.<sup>4</sup> La peau offre également une protection à toutes les composantes du corps humain contre les rayons ultraviolets du soleil par la présence de la mélanine dans les mélanocytes. Leurs présences augmentent avec l'intensité de l'exposition au soleil.<sup>2</sup> La peau comprend également divers **récepteurs sensoriels**, comme les cellules de Merkel, ce qui explique pourquoi il s'agit d'un organe sensoriel important.<sup>1; 5</sup> Cet organe joue un rôle dans la **thermorégulation** par la présence de nombreux vaisseaux sanguins serpentant le derme, ce qui permet de conserver ou perdre de la chaleur, dépendamment des besoins.<sup>2; 3</sup> Plusieurs **fonctions métaboliques** sont attribuées à cet organe de grande taille. Ces fonctions permettent notamment à la peau de posséder une réserve de graisse dans les tissus adipeux, de produire de la vitamine D et d'excréter des ions.<sup>1; 3; 6</sup>

## 1.2. Structure de la peau

La peau est un organe constitué de trois couches différentes ayant chacune un rôle précis à jouer. La Figure 1 présente chacune de ces couches. L'épiderme, la couche la plus externe, est directement en contact avec l'environnement.<sup>7</sup> Le derme est la couche centrale, alors que l'hypoderme est la couche la plus interne.<sup>1</sup>



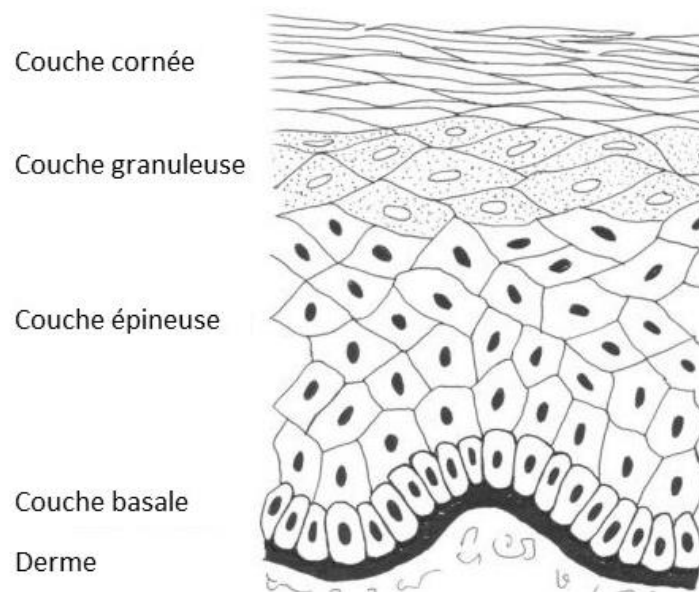
**Figure 1. Structure de la peau**

La peau comprend trois couches ayant chacune des fonctions et une structure qui leur est propre. La couche la plus externe est l'épiderme. Le derme constitue la deuxième couche contenant des tissus conjonctifs et les vaisseaux sanguins de la peau. L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et se constitue principalement de tissus adipeux ainsi que de tissus sous-cutanés. Modifiée de Klosterman, 2008.<sup>7</sup>

### 1.2.1. Épiderme

L'épiderme constitue la couche la plus externe de la peau. Il se compose d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Ce type d'épithélium protège, entre autres, contre l'invasion de pathogènes, bactéries ou tout autre agent infectieux.<sup>1</sup> L'épiderme se compose de quatre couches dans lesquelles les cellules se différencient en un type de cellules particulières qui correspondent à une étape de la maturation des kératinocytes. L'épiderme est ainsi composé, de la base vers la surface en contact avec l'air, de la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 2).<sup>4</sup>





**Figure 2. Couches de l'épiderme**

L'épiderme se compose de quatre couches différentes. La première est la couche basale où naissent les cellules. Ensuite se trouve la couche épineuse, suivie de la couche granuleuse contenant des basophiles granulaires. L'épiderme est complété par la couche cornée composée de kératinocytes en contact avec l'environnement externe du corps. Modifiée de Wicket *et al.* 2006.<sup>8</sup>

La **couche basale**, aussi dite germinative, est constamment en prolifération puisqu'il s'agit du commencement de la production des kératinocytes.<sup>2</sup> Elle est responsable du renouvellement des kératinocytes où des mitoses se déroulent continuellement.<sup>9</sup> Dans la couche basale, des cellules de Merkel et des mélanocytes sont visibles. Ces cellules permettent respectivement de percevoir la sensation liée au toucher et de produire la mélanine qui augmente en nombre lors d'une exposition au soleil.<sup>2; 9; 10</sup> La **couche épineuse** (*stratum spinosum*) constitue la plus grande partie de l'épiderme. Les cellules qui la compose sont de forme polyédrique près de la couche basale, puis ces cellules auront tendance à s'aplatir en s'approchant de la couche granuleuse.<sup>9</sup> Entre les cellules se trouve des tonofilaments qui lient les desmosomes entre eux pour permettre aux différentes cellules de se tenir ensemble.<sup>2</sup> L'espace restant entre les cellules est comblé par les mélanocytes et les cellules de Langerhans, ces dernières étant capable de reconnaître certains antigènes.<sup>9</sup> La **couche granuleuse** (*stratum granulosum*) comprend des kératinocytes granuleux contenant des grains de kératohyaline, riches en protéines et en acides aminés, ainsi que des tonofilaments.<sup>1; 9; 11</sup> L'association des grains de kératohyaline et des tonofilaments forme la kératine lors de la kératinisation.<sup>9</sup> Les cellules perdent graduellement leur cytoplasme et leur noyau pour

laisser place à des cellules kératinisées aplaties qui forment éventuellement la **couche cornée** (*stratum corneum*).<sup>2; 4</sup> Les cellules de cette couche sont éliminées en permanence pour faire place aux nouvelles cellules provenant des couches inférieures.<sup>9</sup>

### 1.2.2. Derme

Le derme offre un support mécanique, de la souplesse et permet à la peau de résister à la traction.<sup>9</sup> Il est composé d'un tissu conjonctif fibreux<sup>9</sup> et contient les vaisseaux sanguins et les nerfs<sup>2</sup> et se compose de deux couches, le derme papillaire et le derme réticulaire.<sup>2</sup> La première couche, le **derme papillaire**, est constituée de tissus conjonctifs lâches composés de fibres de collagène, fibres élastiques et de cellules.<sup>5</sup> Le derme papillaire est la portion directement sous l'épiderme. Il comprend plusieurs papilles dans lesquelles se trouvent des corpuscules de Meissner.<sup>5; 10</sup> La deuxième couche, le **derme réticulaire**, se trouve à être la partie du derme la plus résistante. Il contient d'épaisses fibres de collagène qui, par leur disposition, sont responsables de l'élasticité de la peau.<sup>5</sup>

### 1.2.3. Hypoderme

L'hypoderme est la dernière couche de la peau. Elle constitue la couche la plus profonde de la peau et comprend le tissu adipeux et les tissus conjonctifs sous-cutanés.<sup>2; 10</sup> Ces tissus permettent de rattacher les autres couches de la peau au corps. Il contribue également au mouvement de la peau permettant le glissement de la peau.<sup>2; 5</sup>

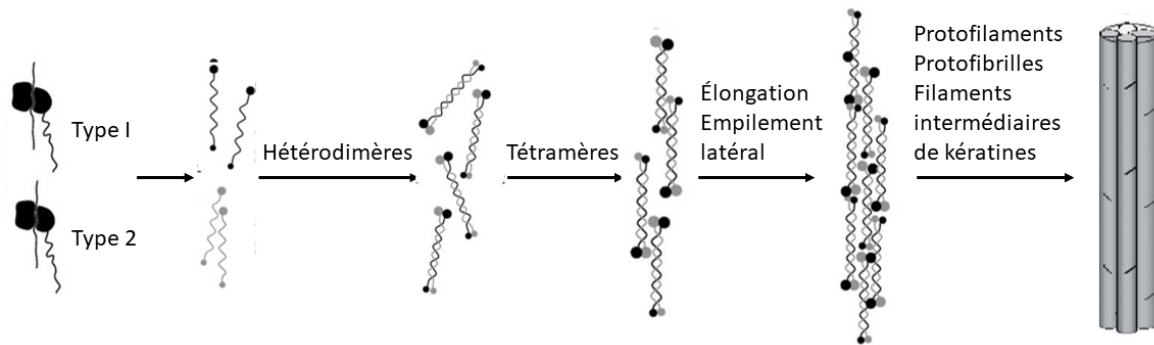
## 1.3. Kératines

Chez l'humain, 54 gènes sont responsables de la formation des kératines.<sup>12; 13</sup> Les kératines sont présentes dans les kératinocytes de la peau, mais également dans les cheveux et les follicules pileux.<sup>1; 12</sup> Dans le corps humain, elles occupent diverses fonctions : support structural, cytoarchitecture, réponse au stress, régulation des voies de signalisation de l'apoptose et de la synthèse de protéines, ainsi que la distribution des organelles et des vésicules.<sup>12; 14; 15</sup> Les kératines sont divisées en deux types différents. Les kératines de type I (kératines 9 à 40) comprennent des kératines dites acides, alors que les kératines de type II (kératines 1 à 8 et kératines 71 à 86) dites basiques ou neutres.<sup>12; 14; 16; 17</sup> Les deux types de kératines comprennent respectivement 7 à 8 exons et 8 à 9 exons.<sup>18</sup> Le point isoélectrique et

la masse moléculaire des kératines contribuent également à leur classification.<sup>19</sup> Parmi les gènes responsables de la production de ces protéines, 28 gènes sont associés aux kératines de type I et 26 gènes aux kératines de type II.<sup>16</sup> Les kératines de type I sont situées sur les chromosomes 17q21.2 excepté pour la kératine 18 située sur un domaine de la kératine de type II. Les kératines de type II, quant à elles, sont situées sur le chromosome 12q13.13.<sup>12; 20</sup>

Les kératines sont présentes dans la peau, particulièrement dans l'épiderme. Dans chacune des sous-couches de l'épiderme se trouvent des types de kératines différents.<sup>12</sup> Ainsi, les kératines 5 et 14 sont exprimées dans la couche basale, alors que les kératines 1 et 10 le sont dans la couche suprabasale. Les kératines 2 et 10 sont également exprimées dans les couches de l'épiderme les plus externes.<sup>12; 21</sup> Les diverses kératines ne se retrouvent pas simultanément dans tous les endroits du corps. De ce fait, la kératine 9 est retrouvée dans la paumes les mains et les plantes des pieds, alors que les kératines 6 et 16 sont non seulement présentes dans les épithéliums oraux, mais elles sont présentes lors de trauma sur la peau, comme c'est le cas pour la kératine 17 également.<sup>21</sup>

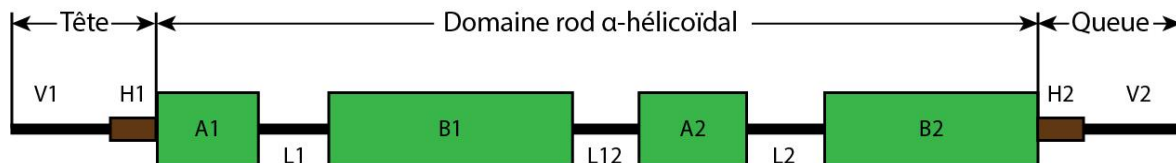
Les kératines constituent une grande famille de filaments intermédiaires nommée filaments intermédiaires de kératines (KIF).<sup>22; 23</sup> Les KIF se composent de deux kératines, soit l'une de type I et l'autre de type II, pour former les hétérodimères de kératine.<sup>20</sup> Ces derniers s'alignent ensuite pour former des tétramères qui vont subir une élongation pour finalement former les filaments intermédiaires de kératine.<sup>20</sup> Les étapes de la formation des filaments intermédiaires de kératines sont présentées à la Figure 3.



**Figure 3. Formation des filaments intermédiaires de kératine**

Les ARN messagers sont traduits en kératines de type I et type II par des ribosomes. Une kératine de type I et une kératine de type II s'assemblent pour former des hétérodimères, qui, par la suite, se lient entre eux pour former des tétramères. Les tétramères s'élongent pour ultimement former les filaments intermédiaires de kératine. Adaptée de Uitto *et al.* 2007.<sup>20</sup>

Les kératines ont également une structure bien particulière, selon le type dont il s'agit.<sup>12; 14</sup> La différence entre les deux types de kératine réside dans la présence des domaines H1 dans la tête et H2 dans la queue de la kératine de type II.<sup>16; 19; 24</sup> Chacune se compose de trois parties distinctes, soit la tête, le centre et la queue de la protéine (de l'anglais *domain head*, *gene body* et *domain tail*).<sup>12; 24</sup> La tête et la queue de ces protéines sont non-hélicoïdales et sont constitués respectivement des domaines H1 et V1, ainsi que des domaines H2 et V2.<sup>18; 20</sup> La portion centrale constitue la portion alpha hélicoïdale de la protéine et comprend les domaines A1, B1, A2 et B2.<sup>20</sup> La localisation de chacun de ces éléments est illustrée à la Figure 4.



**Figure 4. Structure générale des kératines de type I et II**

Les kératines de type I et II sont composées d'une tête et d'une queue non-hélicoïdale, ainsi que d'un centre alpha-hélicoïdal. Le domaine central est constitué des domaines 1A, 1B, 2A, 2B, L1, L2 et L2. La tête se compose des domaines V1 et H1, alors que la queue comprend les domaines V2 et H2. Inspirée de Arin (2009) et Smith (2003).<sup>12; 25</sup>

Des mutations dans une ou plusieurs kératines peuvent entraîner plus de 60 maladies dermatologiques génétiques différentes.<sup>17</sup> L'épidermolyse bulleuse simplex dont les mutations peuvent se trouver dans les gènes *KRT5* ou *KRT14*, est un exemple de maladie affectant la formation des kératines.<sup>26</sup> Les mutations peuvent se trouver à différents endroits dans la protéine, se situant dans la tête, le domaine central ou dans la queue de la protéine.<sup>15</sup> D'autres kératines peuvent entraîner l'apparition de diverses maladies autres que l'épidermolyse bulleuse simplex. Les kératines 1 et 10 causent notamment l'ichtyose épidermolytique, une maladie rare de la peau,<sup>26; 27</sup> alors que les kératines 6, 16 et 17 causent la pachyonychie congénitale, un groupe de génodermatoses entraînant entre autres la kératodermie palmoplantaire.<sup>26</sup>

## 2. ÉPIDERMOLYSES BULLEUSES

Les épidermolyses bulleuses (EB) correspondent à un groupe de maladies dont le problème se situe au niveau de la peau.<sup>28</sup> Dans la plupart des cas, la maladie rend la peau plus fragile et affecte son intégrité structurale, empêchant ainsi les différentes couches qui la composent de se lier entre elles. Il existe plusieurs types d'EB qui se distinguent par les gènes dans lesquels se trouve la mutation responsable du phénotype et de la localisation du clivage dans la peau. L'épidermolyse bulleuse dystrophique, l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle et l'épidermolyse bulleuse simplex sont les trois types majeurs d'EB.<sup>28</sup> Le syndrome de Kindler figure également parmi cette liste. Le Tableau 1 présente la localisation de la maladie au niveau de la peau ainsi que les protéines mutées dans chacun des cas.<sup>28</sup>

**Tableau 1. Localisation et protéines mutées des épidermolyses bulleuses selon les différentes couches de la peau**

Type d'épidermolyse bulleuse	Couche de la peau affectée	Protéine mutée
Épidermolyse bulleuse simplex suprabasale	Épiderme	Transglutaminase 5, Plakglobine, Plaophiline, Desmoplakine
Épidermolyse bulleuse simplex basale	Base de l'épiderme	Kératine 5/14, Plectine, BP230, Exophiline 5
Épidermolyse bulleuse jonctionnelle	<i>Lamina lucida</i>	Intégrine $\alpha 6\beta 4$ , Intégrine $\alpha 3$ , Collagène XVII, Laminine 332
Épidermolyse bulleuse dystrophique	Sub-lamina densa	Collagène VII
Syndrome de Kindler	Base de l'épiderme <i>Lamina lucida</i> <i>Lamina densa</i>	Kindiline-1

Le diagnostic d'une EB est réalisé en identifiant le degré de séparation (ou le clivage) des couches de la peau de l'individu atteint. L'immunofluorescence et les anticorps monoclonaux sont deux techniques pouvant être utilisées pour le diagnostic.<sup>28</sup> Pour déterminer de façon beaucoup plus spécifique le type d'EB dont le patient est atteint, les symptômes sont associés à un type majeur d'EB, puis à un phénotype particulier. Le site de clivage peut ensuite être déterminé pour finalement être en mesure d'établir la mutation

causant la maladie.<sup>28</sup> En 2018, une équipe de chercheurs a travaillé sur une nouvelle forme de diagnostic réalisé à l'aide de séquençage de nouvelle génération et sont parvenus à séquencer près de 21 gènes causant une EB avant de valider les mutations par séquençage Sanger direct.<sup>29</sup>

## 2.1. Épidermolyse bulleuse dystrophique

L'épidermolyse bulleuse dystrophique (EBD) est un type d'EB dont la prévalence est d'une personne affectée sur 500 000.<sup>30</sup> L'EBD est causée par une mutation dans le gène codant pour le collagène VII, soit le *COL7A1*.<sup>31</sup> La maladie entraîne la formation de cloques causées par un problème au niveau du collagène servant à l'ancrage des fibrilles à la *sub-lamina densa*. Leur fonction en est alors altérée ou provoque littéralement leur absence.<sup>32; 33</sup> La sévérité de la maladie dépend de la localisation et de la nature de la mutation dans le gène affecté.<sup>33</sup> L'EBD comprend deux sous-types, soit les formes dominantes (EBDD) et récessives (EBDR), qui diffèrent par leur mode de transmission.<sup>28; 32; 34</sup> Dans certains cas, on retrouve une composante systémique de la maladie, de même que l'affectation des muqueuses.<sup>35</sup> À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour traiter définitivement la maladie, mais divers essais impliquant des technologies d'édition du génome ont été réalisés avec succès sur ce types d'EB.<sup>36; 37</sup> Également, des conseils pour aider les patients atteints de la maladie impliquent le port de vêtements adaptés et des conseils à donner aux professionnels de la santé qui pourraient notamment traiter les patients.<sup>35; 38-40</sup>

## 2.2. Épidermolyse bulleuse jonctionnelle

L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ) est un autre type d'EB pour laquelle la prévalence est d'un individu atteint pour 350 000 personnes.<sup>30</sup> L'EBJ entraîne également la formation de cloques, cette fois-ci causées par un problème au niveau de la *lamina lucida* de la membrane basale de la peau.<sup>28</sup> La maladie est causée par une mutation dans le gène *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A*, *ITGB4* ou *ITGA6*.<sup>28; 41-43</sup> Une mutation dans l'un d'entre eux entraîne l'absence ou la réduction de la production de la protéine.<sup>28</sup> Ce phénomène est généralement causé par un codon de terminaison présent prématurément, ce qui peut entraîner la formation d'une protéine tronquée.<sup>44</sup> La maladie se divise en plusieurs sous-types : l'EBJ-généralisée sévère (auparavant Herlitz), l'EBJ-généralisée intermédiaire

(auparavant non-Herlitz) et l'EBJ-localisée.<sup>28; 43</sup> Ces formes se distinguent entre elles par les gènes sur lequel se situe la mutation causant le phénotype de la maladie. Par exemple, les patients atteints de la forme généralisée sévère auront davantage des mutations dans les gènes liés à la laminine que ceux atteints de la forme généralisée intermédiaire pour laquelle la mutation responsable sera située dans d'autres gènes comme *COL17A1*.<sup>43</sup> Pour soulager quelque peu les patients, des mesures comme le choix des fibres constituant les vêtements peuvent être mises en place puisque certaines pourraient notamment éviter d'aggraver les blessures.<sup>35</sup>

### 2.3. Syndrome de Kindler

Le syndrome de Kindler (SK) fait partie du regroupement des épidermolyses bulleuses puisqu'il entraîne la formation de cloques à divers niveaux de la peau pendant l'enfance, soit au niveau des kératinocytes basaux, de la *lamina lucida* ou de la *lamina densa*.<sup>45; 46</sup> Des anomalies dans la pigmentation, de même qu'une atrophie de la peau, sont d'autres symptômes de la maladie qu'il est possible d'observer.<sup>46</sup> La maladie est causée par une mutation dans le gène codant pour la kindlin-1 (*FERMT1*), une protéine permettant la connexion du cytosquelette d'actine des kératinocytes basaux à la matrice extracellulaire.<sup>32</sup> La kindlin-1 joue également un rôle dans l'adhésion cellulaire.<sup>32</sup> Les symptômes sont généralisés et les personnes atteintes ont davantage de risques de développer des carcinomes à cellules squameuses.<sup>28</sup> Un traitement curatif n'est pas disponible. Toutefois, un regroupement d'experts en maladies dermatologiques ont conçu un guide comprenant des manières de soulager quelque peu les malades, de par le port de vêtements ou de bandages adaptés à leur condition.<sup>35</sup>

### 2.4. Épidermolyse bulleuse simplex

L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) est une maladie rare de la peau dont la prévalence est d'un patient atteint pour 35 000 à un sur 150 000 au niveau mondial.<sup>47</sup> La maladie se transmet généralement de façon autosomique dominante, bien que, dans certains cas, la transmission soit récessive.<sup>48-50</sup> Les formes récessives comprennent, entre autres, l'EBS avec pigmentation mouchetée (EBS-PM), l'EBS avec dystrophie musculaire (EBS-DM) et l'EBS avec atrophie pylorique (EBS-AP).<sup>32</sup> Dans la majeure partie des cas, la maladie



est causée par une mutation dans le gène *KRT5* ou *KRT14* codant respectivement pour les kératines (K) 5 et 14.<sup>28</sup> Ces deux kératines, exprimées par les kératinocytes basaux de l'épiderme, se lient normalement entre elles pour former les hétérodimères de kératines permettant de maintenir le cytosquelette des kératinocytes de la couche basale.<sup>28</sup> Une mutation entraîne des malformations au niveau des kératines occasionnant un clivage intra-épidermique, provoquant une fragilité extrême de la peau.<sup>51</sup> Un léger frottement, comme le frottement des vêtements sur le corps, peut entraîner la formation des cloques caractéristiques de la maladie. De l'infection et de l'inflammation figurent aussi parmi les symptômes visibles. D'autres gènes comme *PLEC*, *EXPH5* et *KLHL24* peuvent également être la cause de la maladie, mais sont responsables de sous-types plus rares d'EBS.<sup>28; 52-55</sup> Les gènes pouvant être associés à l'épidermolyse bulleuse simplex sont présentés dans le Tableau 2.

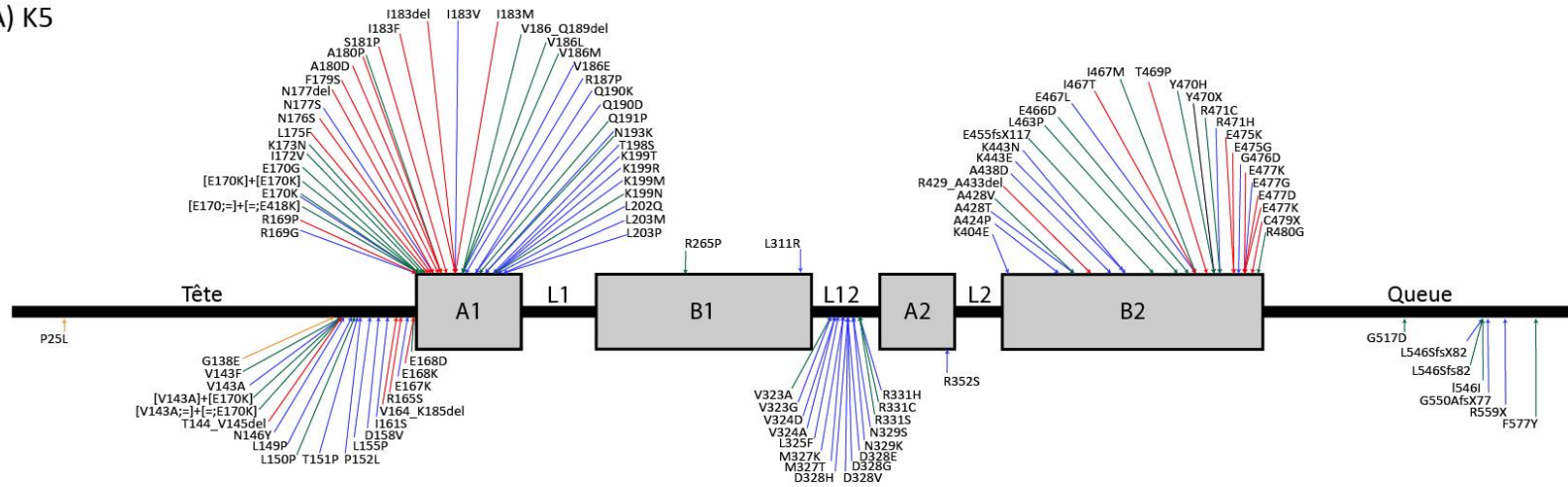
**Tableau 2. Gènes mutés responsables de l'épidermolyse bulleuse simplex**

Gène muté	Localisation chromosomique	Protéine	Mode de transmission	Nombre de mutations répertoriées <sup>55</sup>
<i>DSP</i>	6p24.3	Desmoplakine	AR	265
<i>PKP1</i>	1q32.1	Plakophiline 1	AR	16
<i>JUP</i>	17q21.2	Plakoglobine	AR	40
<i>KRT5</i>	12q13.13	Kératine 5	AD	151
<i>KRT14</i>	17q21.2	Kératine 14	AD, AR	114
<i>PLEC1</i>	8q24.3	Plectine	AR, AD	92
<i>DST</i>	6p12.1	BPAG1	AR	6
<i>EXPH5</i>	17q25.1	Exophiline 5	AR	8
<i>TGM5</i>	10q24.3-q25.1	Transglutaminase 5	AR	26
<i>KLHL24</i>	3q27.1	Protéine Kelch-like 24	AD	5

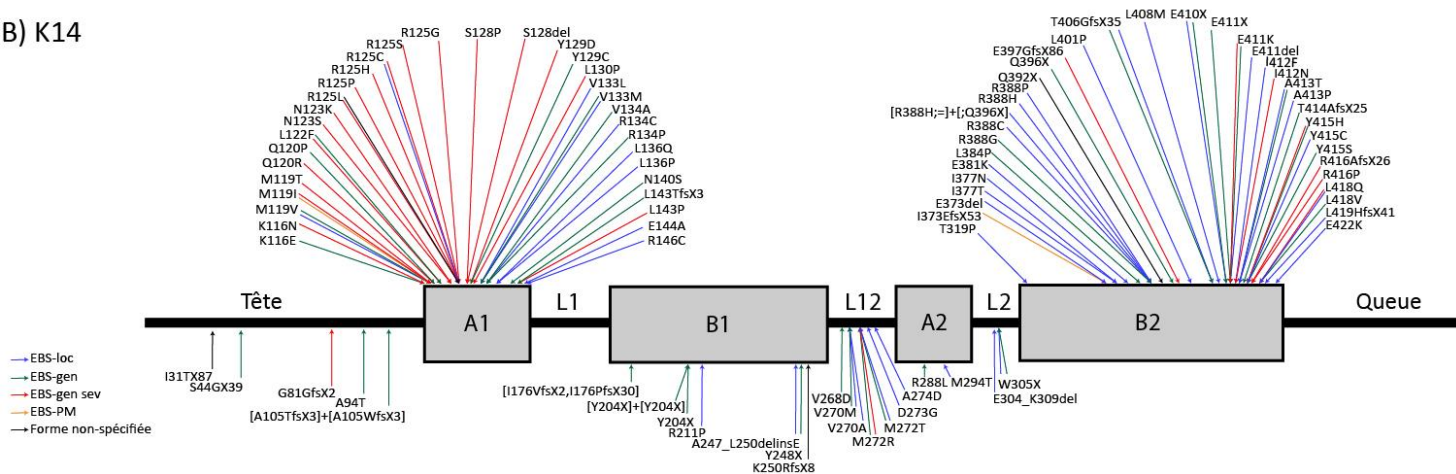
\* AD=Autosomique dominant, AR=Autosomique récessif

Plusieurs formes de la maladie existent et leur sévérité se distingue par plusieurs facteurs, dont la localisation de la mutation dans le gène causant l'EBS, la localisation des cloques sur le corps du patient et le degré de clivage de la peau.<sup>17; 19</sup> Fine et ses collaborateurs ont fait la plus récente classification des sous-types d'EBS.<sup>28</sup> Ces trois formes d'EBS sont les formes localisée, généralisée intermédiaire et généralisée sévère.<sup>28</sup> Les différentes mutations responsables de l'épidermolyse bulleuse simplex sont présentées dans la Figure 5 et sont issues de la *Human Intermediate Filament Database*.<sup>56</sup>

A) K5



B) K14



**Figure 5. Localisation des mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex sur les protéines K5 et K14**

Les domaines A1, L1, B1, L12, A2, L2 et B2 correspondent au domaine rod  $\alpha$ -hélicoïdal. Les couleurs des flèches indiquent le sous-type de la maladie à laquelle la mutation est rattachée. Les mutations liées à la forme localisée sont représentées par les flèches bleues, à la forme généralisée intermédiaire à celles en vert, à la forme généralisée sévère de couleur rouge et les flèches orange sont associées à la forme avec pigmentation mouchetée. Enfin, les flèches noires correspondent à des mutations dont le sous-type n'est pas spécifié. ©Lindsay Girard, 2019

#### **2.4.1. Épidermolyse bulleuse simplex localisée**

La forme localisée (EBS-loc), autrefois appelée Weber-Cockayne, est la forme d'EBS la moins sévère.<sup>28</sup> Les cloques sont présentes sur la paume des mains et la plante des pieds. Les premiers symptômes apparaissent généralement tôt à l'enfance, au moment auquel l'enfant commence à marcher et par le fait même, à se traîner sur le sol, engendrant un trauma mécanique important.<sup>28</sup> Les cloques ainsi formées ne créent pas de cicatrices visibles après le processus de cicatrisation, comparativement aux autres sous-types d'EBS.<sup>18; 26</sup> Les mutations causant l'EBS-loc se situent plus fréquemment dans le domaine 2B de la protéine mutée, soit davantage dans le corps de la protéine.<sup>17; 57</sup> Toutefois, en 2009, il a été démontré qu'une mutation dans le domaine A1 de la kératine 5 pouvait causer la maladie,<sup>58</sup> alors que des mutations dans le domaine L12 ont été détectées par une autre équipe de recherche plusieurs années auparavant.<sup>59</sup>

#### **2.4.2. Épidermolyse bulleuse simplex généralisée intermédiaire**

La forme généralisée-intermédiaire (EBS-gen), appelée auparavant Koebner, est la forme intermédiaire des EBS. Cette forme provoque l'apparition de cloques à différents endroits sur le corps.<sup>60</sup> Les cloques sont plus localisée que dans les cas les plus sévères.<sup>26</sup> Les premiers symptômes de l'EBS-gen apparaissent dès la naissance de l'enfant ou très tôt dans l'enfance.<sup>28; 57</sup> Les mutations causales se trouvent habituellement dans le corps du gène (portion centrale).<sup>57</sup> Des études immunochimiques ont permis d'observer les agrégats de tonofilaments dans les kératinocytes basaux qui sont des caractéristiques particulières à ce sous-type d'EBS.<sup>22</sup>

#### **2.4.3. Épidermolyse bulleuse simplex généralisée sévère**

La forme généralisée sévère (EBS-gen sev), autrefois connue sous le nom d'EBS Dowling-Meara, est la forme d'EBS la plus sévère.<sup>28</sup> La présence de cloques est généralisée, et donc située partout sur tout le corps.<sup>26</sup> Les cloques apparaissent dès la naissance de l'enfant, affectant grandement sa qualité de vie et peuvent mener à son décès en très bas âge dans les formes les plus extrêmes.<sup>26; 61</sup> Le kératoderme palmoplantaire ainsi qu'une dystrophie des ongles peuvent également être observés chez les enfants atteints.<sup>26</sup>

Généralement, les mutations causant la maladie se situent autour de l'initiation de l'hélice alpha et des motifs de terminaisons en périphérie des domaines A1 et 2B.<sup>17</sup>

#### **2.4.4. Autres phénotypes associés à l'EBS**

L'EBS peut être associée à différents phénotypes des formes dominantes de la maladie. La première est l'épidermolyse bulleuse simplex avec pigmentation mouchetée (EBS-PM), une forme autosomale dominante. Parmi les symptômes se trouve la présence de cloques, comme c'est le cas pour les autres sous-types de la maladie. Les cloques peuvent se retrouver, dépendamment des personnes, à un endroit précis sur le corps ou réparti de façon aléatoire. Leur répartition est similaire à la forme localisée ou à la forme généralisée.<sup>62</sup> L'apparition des cloques se produit à la naissance.<sup>28</sup> Comme le nom de la maladie l'indique, la peau du patient présente une pigmentation mouchetée, c'est-à-dire que des taches brunes sont présentes sur la peau du tronc et des membres.<sup>28; 63</sup> Les mutations causant l'EBS-PM se situent généralement dans la partie centrale de la protéine, soit le domaine rod alpha hélicoïdal, portion généralement impliquée dans l'hétérodimérisation des kératines de type I et de type II lors de la formation des FIK.<sup>64; 65</sup> Dans certains cas, la maladie est causée par une mutation dans le gène *KRT5*, plus particulièrement dans le domaine V1 de la tête de la protéine.<sup>65</sup> D'autres mutations ont aussi été trouvées dans le domaine V2 de la queue de la kératine 5.<sup>66-68</sup>

L'EBS avec dystrophie musculaire (EBS-DM) est un type d'EBS causé par une mutation autosomale récessive dans le gène *PLEC* codant pour la plectine.<sup>69</sup> Cette forme d'EBS serait principalement causée par une mutation dans l'exon 31 du gène *PLEC* au niveau du rod domain.<sup>70</sup> La plectine est une protéine impliquée dans la formation des hémidesmosomes puisqu'elle permet de sécuriser les FIK aux sites d'attachement.<sup>54; 71</sup> La maladie entraîne l'apparition de cloques à différents endroits sur le corps dès la naissance, alors que la dystrophie musculaire apparaît plus tardivement dans le développement de l'enfant, soit pendant l'enfance ou à l'âge adulte.<sup>28</sup> Dans certains cas, l'EBS-DM peut s'accompagner d'alopécie, soit de la perte de cheveux.<sup>69</sup>

L'EBS avec atrésie pylorique (EBS-AP) est un autre phénotype souvent associé à l'EBS.<sup>28</sup> L'EBS-AP se transmet par une mutation récessive dans les gènes *ITGA6* et *ITGB4*, mais également le gène *PLEC*.<sup>72; 73</sup> Il a été démontré que contrairement à l'EBS-DM, la mutation causant l'EBS-AP se trouve à l'extérieur de l'exon 31 du gène *PLEC*.<sup>70; 73</sup> Cette maladie entraîne la formation de cloques à divers endroits sur le corps, et ce, dès la naissance. Le patient présente parfois de l'anémie, un retard de croissance et des anomalies, notamment au niveau des tissus mous.<sup>28</sup>

## **2.5. Essais thérapeutiques**

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour soulager définitivement les patients atteints d'EBS.<sup>74; 75</sup> Pour soulager leurs symptômes, les patients peuvent apposer des bandages sur les régions du corps affectées, utiliser régulièrement des antidouleurs ainsi que des antibiotiques et privilégier le port de vêtements qui évitent le frottement et réalisés dans des matériaux n'entraînant pas de douleur excessive.<sup>35; 47; 74</sup> Avec les années, plusieurs groupes de recherches en sont venus à établir des lignes directrices pour le soulagement de la douleur des patients.<sup>35; 39</sup> Diverses équipes de chercheurs ont fait des tentatives avec certains médicaments tels que des antibiotiques puissants,<sup>74</sup> ou encore en produisant la protéine défectueuse,<sup>76</sup> mais aucun de ces traitements n'a obtenu de résultats concluants. Jean-Christophe Chamcheu et son équipe ont réalisé plusieurs projets de recherche impliquant des protéines chaperonnes comme le triméthylamine N-oxyde.<sup>77</sup> Ils ont également vérifié si les protéines chaperonnes peuvent protéger les kératinocytes contre le stress causé par une exposition prolongée à la chaleur.<sup>77</sup> En 2017, l'équipe de Aushev publiait une étude portant sur l'utilisation d'une technologie d'édition du génome sur des kératinocytes de patients atteints de l'EBS.<sup>78; 79</sup>

La Pr Catherine Laprise a développé un programme de recherche sur l'EBS et construit une biobanque constituée de tissus de patients qui sont atteints d'EBS et de témoins sans EBS pairés pour l'âge et le sexe avec les patients. Au total, ce sont des échantillons biologiques provenant de 23 personnes qui sont disponibles, dont 11 individus témoins appariés à 12 individus atteints de la maladie et dont le diagnostic est confirmé par un dermatologue ou un pédiatre spécialisé en dermatologie. Pour chacun de ces patients,

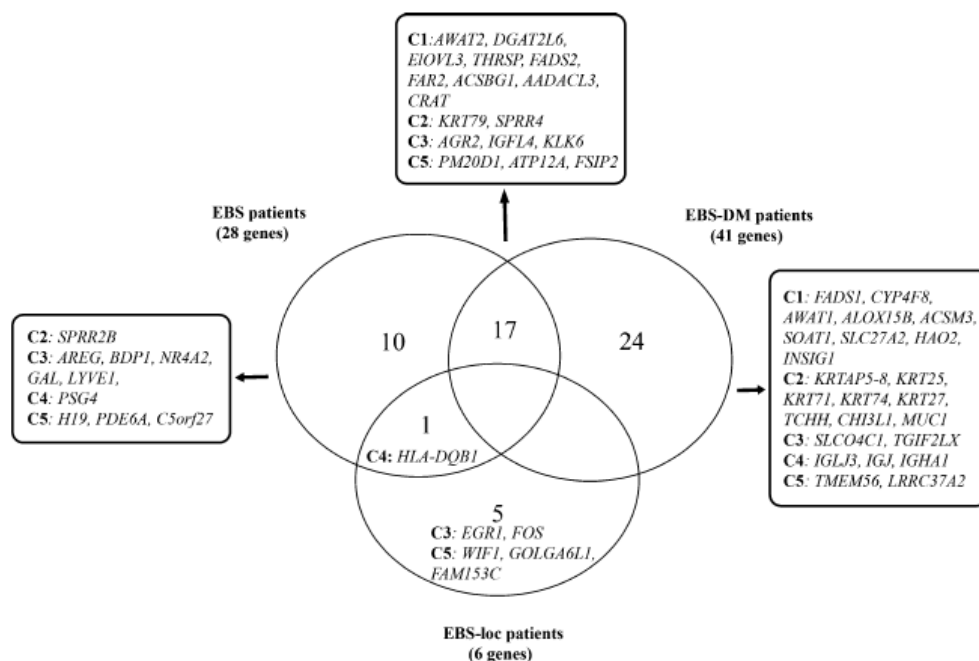
différents types cellulaires issus de biopsies cutanées sont disponibles. Ainsi, des biopsies cutanées sont conservées dans l'azote liquide et des lignées de fibroblastes et des kératinocytes primaires et immortalisés sont également disponibles pour ces individus. Des échantillons de sang permettent aussi d'avoir accès à l'ADN et l'ARN de ces patients. Les formes généralisées et localisées sont présentes dans la biobanque,<sup>80</sup> de même que la forme avec pigmentation mouchetée.<sup>62</sup> Le Tableau 3 présente les informations relatives à chacun des patients pour lesquels la mutation causant la maladie a été identifiée, soit le sous-type d'EBS dont ils sont atteints, la localisation de la mutation dans le gène affecté, la mutation dans la protéine affectée, le gène affecté, l'exon et le domaine du gène où la mutation est présente.<sup>80</sup>

**Tableau 3. Mutations présentes chez les patients atteints d'épidermolyse bulleuse simple**

Patient	Sous-type d'EBS	Mutation dans le gène	Mutation dans la protéine	Gène	Exon	Domaine	Références
EBS1	EBS-loc	1130T>C	I377T	<i>KRT14</i>	6	2B	80; 81
EBS2	EBS-gen sev	449T>C	L150P	<i>KRT5</i>	1	H1	80; 82
EBS9	EBS-loc	980T<C	M327T	<i>KRT5</i>	4	L1-2	59; 80
EBS10	EBS-loc	1234A>T	I412F	<i>KRT14</i>	6	2B	80; 83
EBS12	EBS-loc	1675C>T	R559X	<i>KRT5</i>	9	Tail	80
EBS17	EBS-PM	74C>T	P25L	<i>KRT5</i>	1	Head	62
EBS21	EBS-gen sev	373C>A	R125S	<i>KRT14</i>	1	1A	80

L'équipe de la Pre Catherine Laprise a, jusqu'à présent, réalisé divers travaux de recherche ayant pour objectif de documenter les mutations provoquant l'EBS et de déterminer si certaines molécules peuvent avoir un effet thérapeutique pour les patients atteints de l'EBS. Ainsi, Bchetnia *et al.*<sup>80</sup> a permis d'identifier les mutations connues responsables pour tous les patients par séquençage des gènes *KTR5* et *KTR14* en plus d'identifier deux nouvelles mutations responsables soit 1675C>T pour le patient EBS12 et 373C>A pour le patient EBS21. L'étude du patron d'expression génomique à partir d'une biopsie cutanée de chaque individu étudié a permis de découvrir que 28 gènes sont exprimés différemment chez les patients atteints d'EBS. Plus spécifiquement, les gènes affectés sont

impliqués dans le métabolisme des acides gras (9 gènes), le processus de kératinisation (3 gènes), la croissance et la prolifération cellulaire (8 gènes), la réponse immunitaire (2 gènes), ainsi que dans diverses autres fonctions (8 gènes).<sup>78</sup> La Figure 6 illustre les gènes qui sont différemment exprimés dans la peau de patients atteints d'EBS comparativement à ce que l'on observe dans la peau de témoins.<sup>80</sup>



**Figure 6. Gènes associés aux différents sous-types d'épidermolyse bulleuse simple dans l'étude québécoise**

Cette étude a permis de distinguer les gènes différemment exprimés selon la forme d'épidermolyse bulleuse simple comparativement aux individus non atteints. Bchetnia *et al.* 2012.<sup>80</sup>

Un second projet de recherche, réalisé en 2013, a permis de comparer le patron d'expression d'un patient atteint d'EBS-MP (ayant la mutation P25L) et d'un témoin non atteint.<sup>62</sup> Ce projet a permis de démontrer que 52 gènes sont différemment exprimés entre le patient atteint d'EBS-MP et les témoins sans EB.<sup>62</sup> Le projet de recherche a également permis de déterminer que le gène *TYR* est potentiellement impliqué dans la pathologie. Ce gène est connu pour être associé à l'albinisme puisqu'une mutation dans ce gène affecte la biosynthèse de la mélanine de la peau.<sup>84</sup> Ceci suggère que la biosynthèse de la mélanine serait modulée dans le contexte de la pathologie EB.

La plus récente publication de l'équipe dirigée par la Pre Laprise avait pour objectif de trouver un traitement potentiel pour soulager les patients atteints de l'EBS à l'aide de molécules chaperones.<sup>85</sup> Dans ce projet le triméthylamine-N-oxyde (TMAO) et le sodium-4-phenylbutyrate (4-PBA) ont été évalués pour leur potentiel thérapeutique. La mesure de l'efficacité de ces molécules était faite par comparaison des agrégats de kératine observés dans les cellules des malades avant et après traitement. Si un traitement est efficace, l'hypothèse étant que ces molécules apportent une activité stabilisatrice et permettent d'aider au repliement de la protéine, une réduction du nombre d'agrégats de kératine dans le cytoplasme devrait être observée.<sup>86; 87</sup> Les résultats ont démontré que le TMAO pourrait prévenir la formation d'agrégats de kératine dans les cellules en procédant à la restauration des protéines qui sont mal repliées ou en entraînant la dégradation des protéines problématiques.<sup>77; 85</sup>

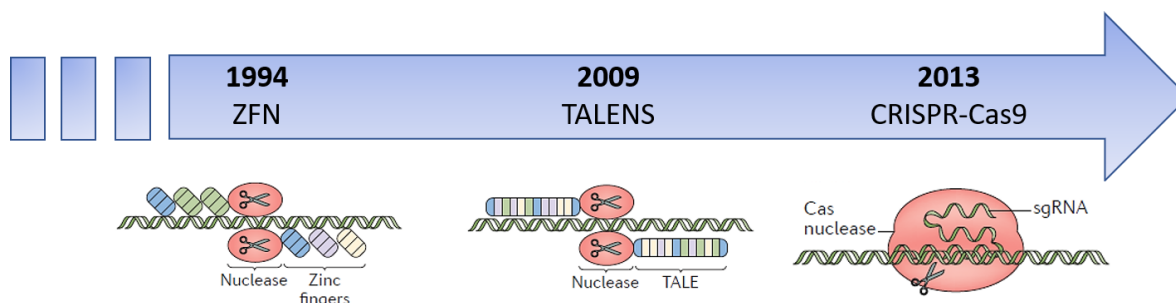


### 3. TECHNOLOGIES D'ÉDITION DU GÉNOME

Plusieurs projets de recherche ont donc été réalisés dans l'espoir de trouver un traitement pour soulager les patients atteints des diverses formes d'EBS. Malheureusement, aucun des résultats n'a permis la mise en place d'une thérapie curative. Pour cette raison, les chercheurs se sont tournés dans les dernières années vers les technologies d'édition du génome pour corriger les mutations responsables de la maladie. Il est maintenant possible de modifier l'ADN du patient dans certaines cellules par la réalisation d'expériences *in vitro*. Ainsi, la mutation d'intérêt peut être remplacée par un fragment d'ADN sain ou le gène ciblé peut être inactivé. Souvent, la façon de procéder dépend de la maladie, de son mode de transmission et de la mutation elle-même. Avec les années, plusieurs technologies ont fait leur apparition dans le monde scientifique.

Les technologies d'édition du génome sont des technologies qui ont beaucoup évolué avec le temps, telles que présentées dans la Figure 7. En effet, elles ont commencé par l'utilisation des méganucléases qui consistaient en une seule enzyme capable de couper l'ADN.<sup>88</sup> En 1994, les nucléases en doigts de zinc ont fait leur apparition.<sup>89; 90</sup> Toutefois, l'utilisation de cette technique impliquait beaucoup d'investissements de temps et d'argent. Il faut attendre jusqu'en 2009, pour qu'une équipe de chercheurs parvienne à concevoir une nouvelle technique pour éditer le génome, soit les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) (de l'anglais *Transcription activator-like effector nucleases*). Cette technologie offrait maintenant une méthode moins coûteuse et moins longue à utiliser, mais la technique est complexe puisque deux longues séquences spécifiques à l'endroit désiré dans le génome sont nécessaires à sa mise en œuvre.<sup>91</sup> Il faut attendre jusqu'en 2013 pour qu'une révolution se produise dans le monde de l'édition génomique par l'apparition de la technologie utilisant une nucléase Cas9 associée à de courtes séquences palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR/Cas9) (de l'anglais *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*).<sup>92</sup> Cette technologie moins complexe, mais plus spécifique, offre dorénavant aux chercheurs une option plus intéressante. Précisément, la méthode CRISPR/Cas9 permet de modifier le génome de façon ciblée, simple et rapide. Cette technique permet de neutraliser des séquences d'ADN ou de les remplacer puisque les séquences CRISPR sont présentes dans la grande majorité des vivants. De plus, depuis son

apparition, plusieurs équipes travaillent entre autres sur de nouvelles variantes de CRISPR/Cas9 permettant l'édition des bases, de sorte à élargir la gamme de possibilités de cette technologie.<sup>93; 94</sup>

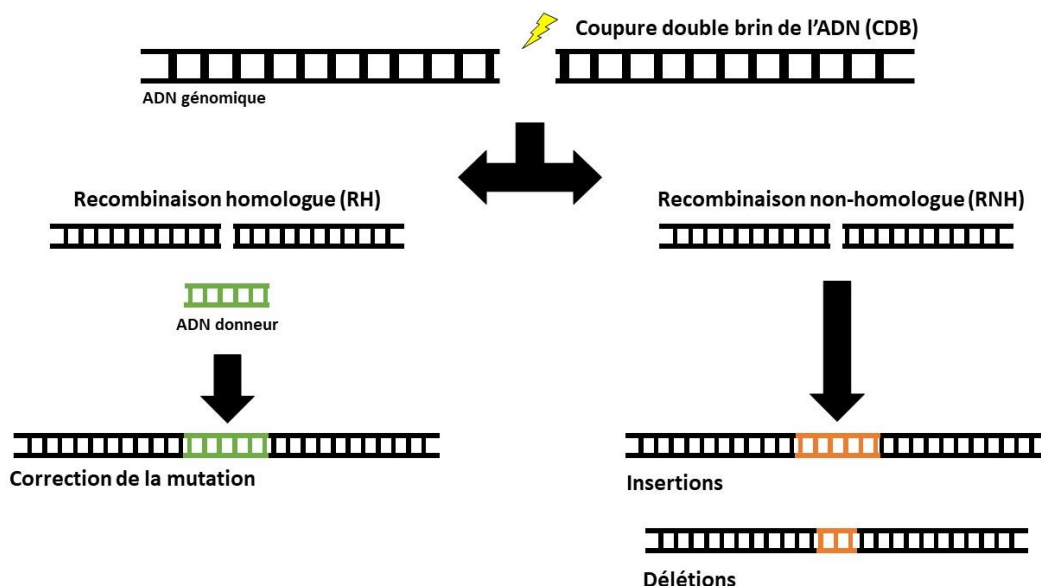


**Figure 7. Évolution des technologies d'édition de l'ADN**

Les technologies d'édition du génome ont beaucoup évolué avec le temps, passant de l'utilisation de protéines et de séquences complexes permettant de couper l'ADN à un endroit précis, à l'utilisation d'une protéine Cas9 et d'une séquence de 20pb seulement pour cibler l'endroit désiré dans le génome.

### 3.1. Fonctionnement général des technologies d'édition du génome

Les technologies d'édition du génome sont des méthodes prometteuses pour l'édition de mutations causant diverses maladies. Ces technologies, bien que toutes différentes les unes des autres, constituent une révolution en permettant de travailler directement dans le génome des individus.<sup>78</sup> Elles fonctionnent toutes selon un principe fondamental similaire. Le mécanisme qu'elles utilisent implique l'induction de coupures double brin (CDB) d'ADN (de l'anglais *double stranded break* : DSB) qui se produisent à des endroits bien précis dans le génome, ciblant ainsi des régions de l'ADN en particulier.<sup>30</sup> Suite à la CDB, la cellule enclenche automatiquement le processus de réparation de l'ADN et la répare sans se soucier de l'ordre des nucléotides, induisant ainsi de nouvelles mutations pouvant être des insertions et des délétions (indels) ajoutées lors de la recombinaison dite non-homologue (RNH) (de l'anglais *non-homologous end-joining* : NHEJ).<sup>95</sup> Pour contrer ce mécanisme, l'insertion d'un fragment d'ADN donneur exempt de mutation dans la séquence permet de procéder à de la recombinaison homologue (RH) (de l'anglais *homology directed repair* : HDR)<sup>95</sup>, permettant alors de corriger la mutation causant le phénotype de la maladie<sup>30</sup>. La Figure 8 explique ce phénomène puisqu'il est possible de voir visuellement ce dont il est question. Donc à la suite de la coupure, on assiste soit à l'ajout de nouvelles mutations si la réparation se fait directement par la cellule, soit à la correction de la mutation causant la maladie si un ADN donneur a été inséré à l'intérieur de la cellule.



**Figure 8. Principe de base de l'édition du génome**

La réparation de coupures double brin de l'ADN (CDB) se produit de deux façons à l'intérieur de la cellule. La première est par recombinaison homologue (RH) consistant à ajouter un fragment d'ADN donneur dans la cellule pour réparer la coupure de l'ADN. La mutation est alors corrigée puisque l'ADN donneur est exempt de mutation. La recombinaison non-homologue (RNH) entraîne la formation d'insertions et de délétions, ajoutant ainsi de nouvelles mutations. Inspirée de Chadwick et Musunuru, 2017. <sup>96</sup>

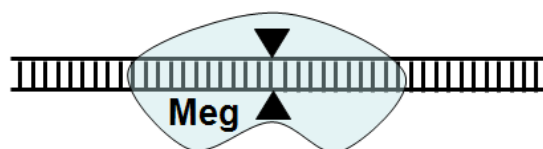
## 3.2. Méganucléases

### 3.2.1. Historique

Les méganucléases, aussi appelées endonucléases naturelles ou « *homing meganucleases* », sont des endonucléases capables d'initier de la RH à un endroit précis dans le génome.<sup>88</sup> Les premières méganucléases, découvertes par Kostriken *et al.* <sup>97</sup> et Jacquier et Dujon,<sup>98</sup> sont dérivées des éléments génétiques permettant la mobilité d'éléments microbiens (levures et bactéries).<sup>88; 99</sup> Elles proviennent des phages, des bactéries, des archéobactéries et de nombreux eucaryotes.<sup>88; 100</sup> Les protéines HO et I-SceI seraient à l'origine des méganucléases et on croyait initialement qu'elles permettaient la reconnaissance de grandes cibles, soit des séquences de plus de 12 paires de bases.<sup>88; 101</sup> À l'état naturel, elles sont des nucléases efficaces, non seulement dans le génome humain, mais également chez les plantes et les insectes.<sup>102; 103</sup> Les méganucléases regroupent 4 grandes familles qui se distinguent en fonction de leur séquence et la structure du motif qu'elles reconnaissent.<sup>104</sup> La famille la plus étudiée est celle des protéines LAGLIDADG.<sup>104</sup>

### 3.2.2. Mode de fonctionnement dans l'édition du génome

Les méganucléases sont capables d'induire une CDB, comme démontré dans la Figure 9.<sup>99; 105</sup> Elles sont en mesure de reconnaître des séquences pouvant être très larges, soit entre 12 et 45 paires de bases (pb).<sup>106; 107</sup> L'utilisation de méganucléases comporte un grand désavantage par rapport aux autres techniques d'édition du génome, car elles nécessitent la présence d'un site de coupure pour la méganucléase dans l'endroit où l'on désire établir la coupure.<sup>100</sup> C'est donc dire que l'utilisation de cette technologie est dépendante de la présence naturelle de site de coupure de méganucléases à l'intérieur de la séquence ciblée dans le génome.<sup>106</sup>



**Figure 9. Mode de fonctionnement d'une méganucléase sur un double brin d'ADN**

Une version très schématisée de la structure de la méganucléase. Son utilisation implique la reconnaissance d'une séquence particulière par la méganucléase. Elle peut alors procéder à la coupure dans le double brin d'ADN. Modifiée de Yu *et al.* 2016.<sup>105</sup>

### 3.2.3. Applications de la technologie

La première utilisation des méganucléases sur des chromosomes de cellules humaines a été réalisée en 1994.<sup>106</sup> Le projet consistait induire une coupure double brin à l'aide d'une méganucléase faisant partie de la famille I-Sce provenant des levures. En 2011, l'équipe de Grosse a utilisé deux types de méganucléases, I-SceI, une méganucléase naturelle, et I-CreI (méganucléase redessinée) pour cliver le virus de l'herpès simplex de type 1, afin de le désactiver. Les chercheurs sont parvenus à démontrer que l'utilisation de cette technique permet d'inhiber les effets du virus à des niveaux faibles et modérés d'infection.<sup>108</sup> En 2016, Izmiryan et son équipe ont quant à eux utilisé les méganucléases pour corriger une mutation dans le gène *COL7A1* causant la EBDR.<sup>109</sup> Les chercheurs ont utilisé quatre types de méganucléases différentes pour tenter de corriger deux mutations causant la maladie. Ils sont parvenus à démontrer qu'il était possible de corriger des mutations dans *COL7A1*, dont l'une des mutations est parmi celles le plus souvent rencontrées chez les patients.<sup>109</sup> Ces applications ne sont que quelques exemples de toute la recherche réalisée à l'aide des méganucléases.

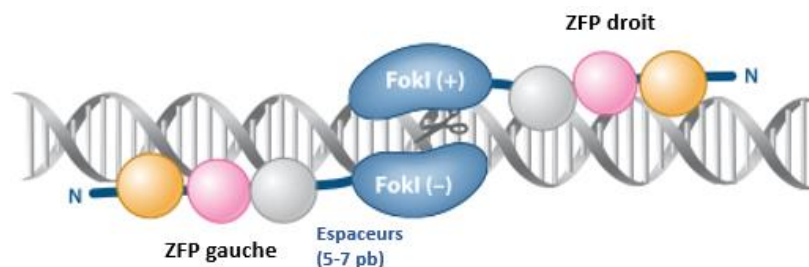
### 3.3. Nucléases en doigts de zinc

#### 3.3.1. Historique

Les nucléases en doigts de zinc (de l'anglais *zinc finger nuclease* : ZFN) ont fait leur apparition après les méganucléases.<sup>89</sup> Elles ont été étudiées pour la première fois par Pavletich et Pabo<sup>110</sup> qui sont parvenus à démontrer que leur structure comprend des protéines en doigts de zinc (de l'anglais *zinc finger protein* : ZFP) constituées de nombreux domaines, soit entre trois et six.<sup>111</sup> Ces ZFP sont à leur tour constituées de trois nucléotides complémentaires à un des brins de la séquence cible.<sup>112</sup> Ensuite, de 1996 à 2003, la méthode a été développée pour permettre son utilisation dans l'édition du génome.<sup>89</sup> La technologie a été modifiée pour permettre la CDB par l'ajout d'une endonucléase de restriction, la *FokI*, originaire des *Flavobacterium okeanoikoites*.<sup>112; 113</sup> Initialement, la *FokI* possède son propre domaine de reconnaissance de séquence, mais ce dernier est adapté pour l'édition du génome.<sup>114; 115</sup>

#### 3.3.2. Mode de fonctionnement dans l'édition du génome

Le mécanisme des ZFN comprend deux éléments principaux : des ZFP capables de cibler une séquence particulière dans le génome et une endonucléase de restriction *FokI* permettant la coupure double brin (présentés dans la Figure 10).<sup>112; 113; 116</sup> Les ZFP sont présentes au nombre de 3 à 6 protéines, ce qui procure à chaque monomère une spécificité allant de 9 à 18 nucléotides puisque chaque ZFP reconnaît trois nucléotides. Également, pour que la CDB ait lieu, l'endonucléase *FokI* doit être présente sous forme de dimère pour augmenter sa spécificité. Pour cette raison, il faut créer deux monomères de ZFP pour cibler les deux brins composant l'ADN. Pour qu'elles exécutent leur travail convenablement, les endonucléases doivent être situées de cinq à sept pb des ZFP.<sup>111</sup> La CDB est provoquée par l'action de l'endonucléase *FokI* qui va couper chacun des brins d'ADN. La région pouvant être ciblée par des ZFP peut contenir de 18 à 36 pb.<sup>117</sup>



**Figure 10. Mode de fonctionnement des nucléases en doigts de zinc**

Les endonucléases FokI sont attachées à des protéines en doigts de zinc (ZFP). Un monomère se trouve sur chacun des brins, car l'endonucléase doit être présente en dimères pour fonctionner. Modifiée de Langner *et al.* 2018 <sup>118</sup>

Les ZFN peuvent être utilisées de deux façons. La première permet d'inactiver un gène en induisant une CDB dans la séquence d'ADN ciblée. Cela provoque alors de la RNH, induisant de nouvelles mutations, soit des indels, causées par le mécanisme de réparation présent naturellement dans les cellules. Ces dernières vont affecter la production de la protéine en produisant de multiples erreurs ou en empêchant carrément sa production.<sup>114</sup> La seconde permet de corriger des mutations causant diverses maladies où la technologie est utilisée pour induire la CDB puis la répare avec la RH à l'aide d'un ADN donneur qui concorde avec la séquence ciblée.<sup>114</sup>

### 3.3.3. Applications de la technologie

Les ZFN ont été utilisées dans différents projets de recherche au fil des ans. En 2011, une revue de littérature à propos de projets de recherche ayant utilisé cette technologie a été réalisée.<sup>116</sup> L'article rapporte, entre autres, des projets impliquant des cellules souches, aussi appelées cellules souches pluripotentes humaines (CSPH).

Premièrement, l'équipe de Lombardo *et al.* <sup>119</sup> a ciblé le locus *IL2RG* à l'aide de ZFN. Certaines cellules modifiées génétiquement ont conservé leurs phénotypes et ont été en mesure de devenir des cellules progénitrices neurales.<sup>116</sup> Ensuite, un projet ayant à l'étude le gène *PIG-A* dans des CSPH a été réalisé en 2009 par l'équipe de Zou *et al.* <sup>120</sup> Ces derniers sont parvenus à démontrer que les ZFN pouvaient être utilisées pour inactiver un gène, de sorte à l'empêcher d'exécuter sa fonction.<sup>120</sup> En 2012, Höher *et al.* ont travaillé sur des kératinocytes souches pour vérifier si les cellules étaient en mesure de garder les modifications qui leur avait été apportées.<sup>121</sup> Il s'avère qu'ils ont découvert qu'en augmentant

la quantité de ZFN utilisée, la cytotoxicité augmente, causant la mort de cellules. Cependant, les cellules dont le gène *eGFP* a été inactivé conservent leur potentiel de pluripotence après la modification du génome. Les cellules sont donc toujours en mesure de croître et de se différencier, en plus d'exprimer des marqueurs caractéristiques de ce type de cellules.<sup>121</sup> Les projets énumérés précédemment ne sont qu'une petite proportion de tout ce qui a été réalisé dans les dernières années. Évidemment, les chercheurs délaissent quelque peu les anciennes technologies d'édition du génome, au profit des nouveaux développements dans ce domaine.

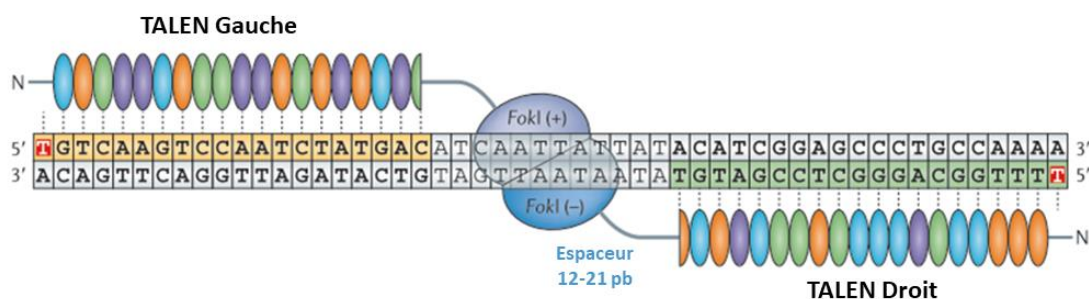
### **3.4. Transcription activator-like effector nucleases**

#### **3.4.1. Historique**

La technologie des nucléases activatrices de type activateur de transcription (de l'anglais *Transcription activator-like effector nucleases* : TALENs) a été découverte à l'origine dans les bactéries de la famille des *Xanthomonas*.<sup>122</sup> Ces bactéries sont reconnues pour infecter des plantes de l'industrie alimentaire. Elles sécrètent des protéines activatrices de transcription (de l'anglais *transcriptor activator-like effectors* : TALE) dans le cytoplasme de leurs cellules par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III.<sup>123</sup> Ces protéines sont responsables de la pathogénicité de la bactérie.<sup>124</sup> Elles se composent de 33 à 35 acides aminés similaires entre eux et la dernière répétition comprend fréquemment 20 acides aminés.<sup>114</sup> La partie N-terminale des TALE permet l'émission d'un signal responsable de la sécrétion et la translocation bactérienne et est appelée répétition zéro (R0).<sup>125</sup> Le domaine central de chaque TALE comprend entre 13 et 28 répétitions.<sup>124</sup> Les paires 12 et 13 contiennent des répétitions variables de di-résidus (RVD) capables de se lier aux bases azotées selon un certain arrangement où l'adénine (A) correspond à la séquence NI, la cytosine (C) à HD, la guanine (G) à NN et la thymine (T) à NG.<sup>95; 114</sup>. Une ou deux parties C-terminales sont également contenues dans les TALEs et contiennent des signaux de localisation nucléaire et un domaine d'activation acide (AD).<sup>125</sup> La structure des TALEs est présentée dans la Figure 11.







**Figure 12. Structure des TALEN induisant une coupure dans le double brin d'ADN.**

Deux endonucléases FokI situées de part et d'autre du brin d'ADN peuvent procéder à la coupure. Pour permettre aux endonucléases de cibler un gène en particulier, des TALE sont choisies selon la cible. Une série de TALE est présente sur chacun des brins d'ADN. Modifiée de Kim et Kim, 2014.<sup>91</sup>

Cette méthode peut être utilisée pour inactiver un gène en allant couper plusieurs morceaux du gène en question. La réparation de la coupure par RNH affectera la production de la protéine, l'empêchant d'exercer sa fonction normale dans la cellule. L'ajout de petites mutations dans le génome peut également affecter l'expression de la protéine. Bien que fort utile, cette technique comporte quelques limites. Elle peut effectivement entraîner des « hors-cibles » (de l'anglais *off-target*), c'est-à-dire des mutations à des endroits différents de la cible initiale.<sup>96</sup> Aussi, lorsque l'on désire utiliser cette technologie, il est préférable de privilégier la création de plus d'une paire de TALE pour une même région puisque l'efficacité varie entre elles. Cela est d'autant plus vrai lorsque les endroits ciblés sont méthylés.<sup>96</sup>

### 3.4.3. Applications de la technologie

Dans la littérature, on retrouve plusieurs études ayant utilisé cette technologie, notamment pour différentes formes d'épidermolyse bulleuse. À titre d'exemple, l'équipe de Osborn *et al.* a utilisé cette technologie pour l'EBDR.<sup>36</sup> Ils ont démontré qu'il est possible d'induire une coupure double brin dans le gène *COL7A1*, car la mutation a été corrigée dans des fibroblastes reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (CSPi) (de l'anglais *induced pluripotent stem cell* : iPSC) montrant l'expression normale de ce gène.<sup>36</sup> L'équipe de chercheurs est parvenue à démontrer que l'utilisation d'une technologie d'édition du génome peut être utilisée pour des maladies pouvant être causées par plusieurs mutations, où chaque patient peut posséder une mutation différente.<sup>36</sup> Puis, Shinkuma *et al.* ont réalisé un

projet de recherche ayant permis de comparer TALEN et CRISPR/Cas9 dans l'EBDD, causée par une mutation dans le gène *COL7A1*.<sup>127</sup> Diverses paires de TALEN et un complexe CRISPR/Cas9 ont été évalués, pour conclure qu'il est possible d'éditer une séquence spécifique du génome. Ils ont également démontré que la différenciation de CSPi corrigées génétiquement en kératinocytes capables d'exprimer la protéine normale est possible.<sup>127</sup> L'équipe de Aushev *et al.* ont utilisés cette même technologie dans l'EBS.<sup>78</sup> Avec TALEN, les chercheurs sont parvenus à inactiver l'allèle mutant dans des kératinocytes immortalisés de patients, de sorte à empêcher l'expression de l'allèle muté.<sup>78</sup> Leur projet de recherche a permis de démontrer l'efficacité de cette technologie sur des maladies causées par des mutations dominantes-négatives.<sup>78</sup> Les travaux de Shinkuma sont arrivés aux mêmes conclusions.<sup>127</sup>

Par ailleurs, cette approche a également été utilisée dans le contexte d'autres maladies rares sans traitement curatif. Ainsi, dans la dystrophie musculaire de Duchenne, une maladie dégénérative entraînant la dégradation des muscles causée par la présence d'une mutation dans le gène codant pour la production de la dystrophine, Li *et al.* ont tenté trois approches différentes impliquant TALEN et CRISPR/Cas dans l'espoir de rétablir la production de dystrophine dans les CSPi des patients atteints.<sup>128</sup> Précisément, les chercheurs ont tenté de (1) sauter un exon, (2) d'induire un décalage du cadre de lecture et (3) d'inactiver un exon.<sup>128</sup> Ils ont conclu que l'inactivation d'un exon était la méthode la plus efficace à appliquer puisque cette approche permettait aux cellules ainsi corrigées de produire la protéine normale.<sup>128</sup>

Ces quelques exemples d'applications de la technologie TALEN permettent d'illustrer le potentiel de cette approche. LaFontaine *et al.* ont réalisé une revue des maladies pour lesquelles cette technologie a été utilisée.<sup>114</sup> Parmi celles-ci figurent notamment l'hémophilie A, la dystrophie musculaire, les infections par le virus de l'immunodéficience humaine, l'hépatite B et la malaria ainsi que divers cancers.<sup>114</sup>

### 3.5. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9)

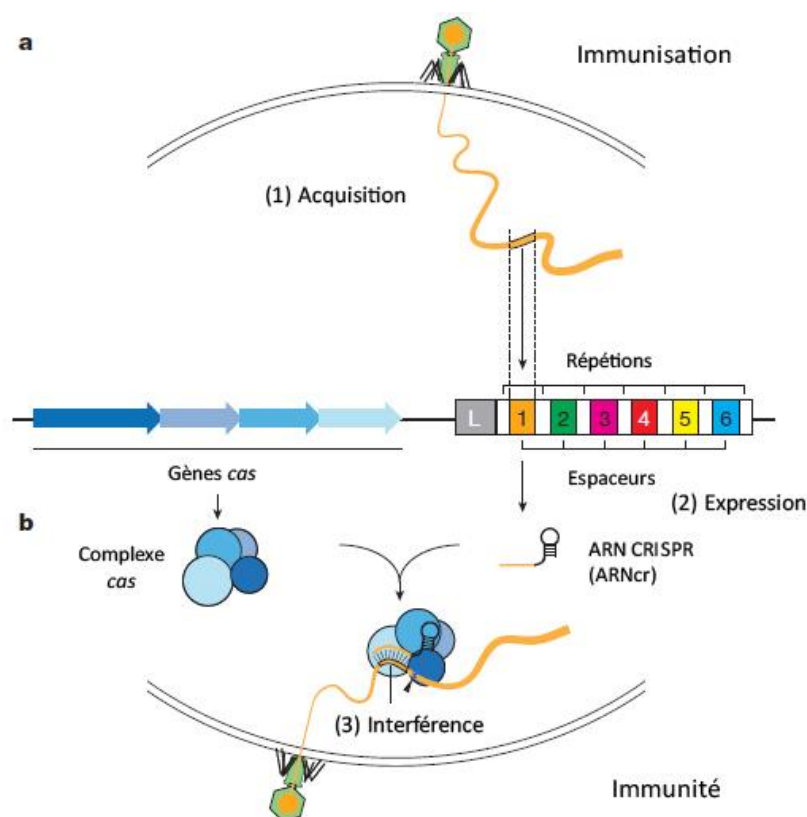
#### 3.5.1. Historique

La découverte de CRISPR/Cas9 a révolutionné le monde de l'édition du génome. Les chercheurs ont dorénavant accès à une méthode peu coûteuse et facile permettant de modifier le génome du vivant dans le but de soulager des patients atteints de maladies monogéniques.<sup>129</sup> Cette nouvelle méthode permet également de cibler plusieurs cibles à la fois.<sup>129</sup> Le nom de la méthode CRISPR/Cas9 est un acronyme pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Bien que sa découverte initiale remonte à 1987,<sup>130</sup> ce n'est toutefois qu'en 2010 que les chercheurs se sont davantage intéressés à cette technologie, lors de la découverte des CRISPR/Cas9 de type II.<sup>89</sup> Effectivement, l'existence de plusieurs types de CRISPR/Cas9 se distinguant par le mécanisme permettant la reconnaissance d'une séquence d'ADN et la façon de procéder à la coupure dans l'ADN ont été démontrés.<sup>89</sup> Elles ont également toutes une signature génétique différente et utilisent des mécanismes de clivage qui diffèrent également.<sup>131; 132</sup> À la suite de ces découvertes, les premières utilisations de CRISPR/Cas9 sur des cellules humaines ont pu être réalisées en 2013.<sup>92</sup>

La méthode CRISPR/Cas9 est originaire des bactéries, plus précisément de *Streptococcus pyogenes*. Les bactéries possèdent un mécanisme de défense, semblable au système immunitaire présent chez les mammifères, leur permettant de se défendre contre les envahisseurs pouvant être des virus, des plasmides ou encore d'autres agents envahissants.<sup>133;</sup><sup>134</sup> Les bactéries parviennent à se protéger de ces envahisseurs en reconnaissant une portion de son génome gardée en mémoire dans une séquence présente à l'intérieur de la bactérie.

Ce système de défense implique une protéine Cas9, un ARN CRISPR (ARNcr) (de l'anglais *CRISPR-RNA*; crRNA) et un ARNcr transactivateur (ARNcrtra) (de l'anglais *transactivator crRNA* : tracrRNA).<sup>135; 136</sup> Le mode de fonctionnement de cette immunité adaptative comprend trois grandes étapes : l'acquisition, l'expression et l'interférence.<sup>134</sup> L'acquisition consiste à acquérir une partie de l'ADN étranger pour l'intégrer dans le *CRISPR array* pour le conserver en mémoire. Le *CRISPR array* est une séquence dans laquelle se trouvent tous les fragments d'ADN étranger accumulé avec le temps (séquences

d'espacement), séparés par ce que l'on appelle des répétitions. Le locus CRISPR, situé près du *CRISPR array*, permet la production des protéines Cas1 et Cas2, pour la réalisation de l'acquisition.<sup>137</sup> L'expression implique la transcription des séquences obtenues à partir des séquences conservées par le CRISPR en ARNcr. L'interférence, où le ARNcr permet de reconnaître l'ADN étranger se produit alors. Son couplage à une protéine de clivage (une protéine Cas) grâce à l'ajout d'un ARNcrtra, permet de procéder à une coupure dans l'ADN étranger, de sorte à initier le clivage de cet ADN. Cela entraîne la destruction de l'ADN étranger. Le processus est présenté dans la Figure 13.<sup>134; 137</sup> Le système CRISPR/Cas9 utilisé pour l'édition du génome est différent de l'immunité adaptative des bactéries puisque que l'on désire utiliser la capacité de ce mécanisme à cibler une séquence précise dans le génome et à procéder au clivage dans le double brin d'ADN.



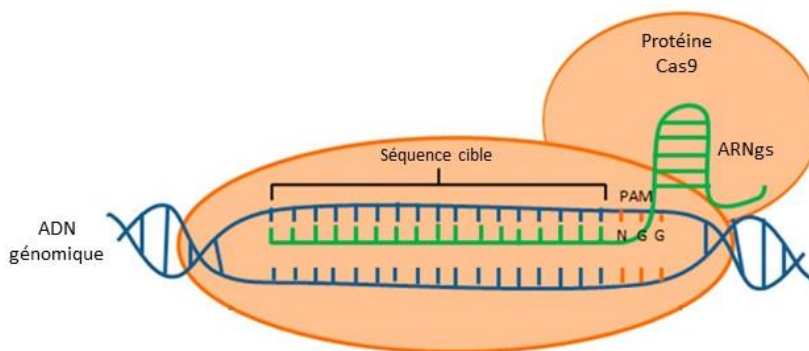
**Figure 13. Fonctionnement de CRISPR/Cas9 au niveau des bactéries**

L'acquisition de l'immunité d'une bactérie contre un agent envahisseur se fait en trois grandes étapes : (1) l'acquisition de l'ADN étranger lors de l'infection de la bactérie par un ADN viral ou plasmidique (2) l'expression des séquences répétées en ARN CRISPR (ARNcr) permettant (3) de reconnaître ces ADN étrangers et finalement les cliver à l'aide des protéines du complexe CRISPR/Cas9. Modifiée de Marraffini, 2015.<sup>138</sup>

### 3.5.2. Mode de fonctionnement

La méthode CRISPR/Cas9 a beaucoup évolué avec le temps. Les multiples recherches menées à son sujet ont permis de non seulement utiliser la technologie pour l'édition du génome en coupant l'ADN, mais également en éditant une base azotée en particulier. Récemment, une technique pour l'édition de l'ARN a en outre fait son apparition dans le monde de l'édition génomique. L'ensemble de ces dernières techniques constituent des dérivés de la méthode originale.

La méthode la plus couramment utilisée est inspirée du mécanisme immunitaire des bactéries<sup>129</sup> et est présentée dans la Figure 14. L'édition du génome avec CRISPR/Cas9 pour réparer l'ADN par RH est la première version de CRISPR/Cas9 utilisée. Ce système est une version simplifiée du mécanisme bactérien et nécessite seulement deux éléments pour rendre possible la correction de l'ADN : la protéine Cas9 et un ARN guide simple brin (ARNgs) de 20 à 22 pb.<sup>117</sup> Ce dernier est une combinaison de l'ARNcr et de l'ARNcrtra guidant la Cas9, lui permettant de cliver le double brin d'ADN<sup>117</sup>. La protéine Cas9 reconnaît quant à elle une séquence de 3 pb dans le génome, le motif protoespaceur adjacent (de l'anglais *protospacer adjacent motif* : PAM) spécifique au type de Cas9 utilisé.<sup>89</sup> Si le PAM est différent de la séquence d'ADN, la Cas9 cherche alors ailleurs dans l'ADN. Lorsque cette séquence est trouvée, l'ARNgs peut se fixer sur l'ADN complémentaire à cette séquence. Cette complémentarité doit être complète pour permettre à la protéine Cas9 d'induire la CDB.<sup>117</sup> Ensuite, le complexe se sépare de l'ADN et peut alors aller chercher de nouveau le PAM dans la séquence d'ADN.<sup>139</sup> La réparation à la suite de la CDB est ensuite réalisée par RNH ou par RH, dépendamment de l'objectif de la manipulation. Dans le cas où on désire corriger une mutation, on utilise un fragment d'ADN donneur double ou simple brin pour réparer la CDB par RH.<sup>140</sup> Il est alors possible d'induire de nouvelles mutations ou de corriger une mutation par le biais de l'ajout d'un fragment d'ADN donneur. La méthode CRISPR/Cas9 est très spécifique et son utilisation relativement simple permet d'éditer plus d'une séquence à la fois, avec une efficacité élevée. Toutefois, l'utilisation de CRISPR/Cas9 peut mener à l'apparition de modifications « hors-cible », où des modifications sont faites sur l'ADN à d'autres endroits que sur la séquence ciblée.<sup>117</sup>



**Figure 14. Mode de fonctionnement de CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome**

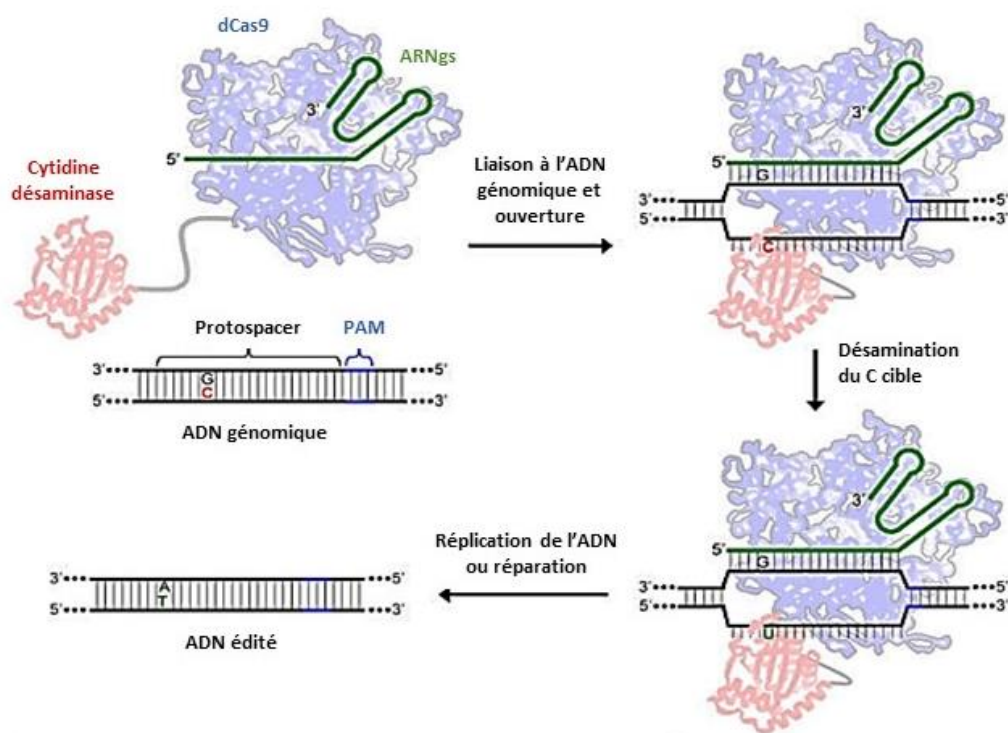
La protéine Cas9 reconnaît le PAM sur la séquence, ce qui lui permet de se fixer sur l'ADN. L'ARNgs se fixe alors sur l'ADN par complémentarité pour reconnaître la séquence. La Cas9 peut alors procéder à la coupure dans le double brin de l'ADN. Modifiée de Kruminis-Kazkiel, 2018.<sup>141</sup>

La méthode CRISPR/Cas9 peut également être utilisée de trois façons pour modifier l'expression des gènes.<sup>129</sup> Dans le premier cas, une protéine Cas9 inactive se fixant sur le gène désiré peut diminuer l'expression d'un gène en empêchant l'élongation de l'ARN messager.<sup>142</sup> Une autre option implique l'utilisation d'une Cas9 couplée à une autre protéine causant la répression de l'expression d'un gène.<sup>143</sup> La troisième approche qu'il est possible d'utiliser est un couplage entre une protéine Cas9 et un activateur de la transcription. Le recours à cette combinaison permet d'augmenter l'expression d'un gène en augmentant la transcription.<sup>144</sup>

La technologie CRISPR/Cas9 a beaucoup évolué dans les dernières années, de sorte à permettre la modification d'un seul nucléotide dans une séquence d'ADN. Effectivement, les technologies des cytidines désaminase et adénosines désaminases, permettant l'édition de bases, ont vu le jour. Elles permettent de corriger un type de mutation en particulier par l'ajout d'une molécule sur une protéine Cas9 dont les domaines de clivages ont été désactivés.<sup>129</sup> Seule la spécificité de la Cas9 a été conservée. Également, la recherche a mené à la découverte de la Cas13 pouvant être utilisée pour corriger une mutation causant une maladie directement dans l'ARNm, avant même la traduction de l'ARNm en protéines.<sup>145</sup>

Ainsi, les cytidines désaminases sont un dérivé de CRISPR/Cas9, soit un éditeur de base de troisième génération.<sup>146</sup> Cette technologie permet la conversion d'une cytosine (C) en uracile (U), ce qui permettra de corriger le C muté puisque le U sera détecté comme étant

une thymine (T) lors de la transduction de l'ADN.<sup>134</sup> Pour que cette approche fonctionne, il faut trois éléments essentiels : une protéine Cas9 désactivée (dCas9) permettant de cibler la région désirée dans l'ADN, une cytidine désaminase pour convertir le C muté en U et un inhibiteur de l'uracile-N-glycosylase (IGU) (de l'anglais *Uracile-N-glycosylase inhibitor* : UGI) pour éviter la reconversion du U en C.<sup>93</sup> Lors de la conversion, présentée dans la Figure 15, la dCas9 reconnaît la séquence du PAM et procède à l'ouverture des deux brins d'ADN, permettant la liaison de l'ARNgs à l'ADN, puis la fixation du complexe. La cytidine désaminase effectue alors la conversion du C en U avant de procéder au changement en T lors de la réplication de l'ADN, puisque les U ont des propriétés similaires au T.<sup>93; 134</sup> C'est lors de la conversion en U que le UGI va empêcher le U de se transformer en C. Le mécanisme détaillé est illustré dans la Figure 15.



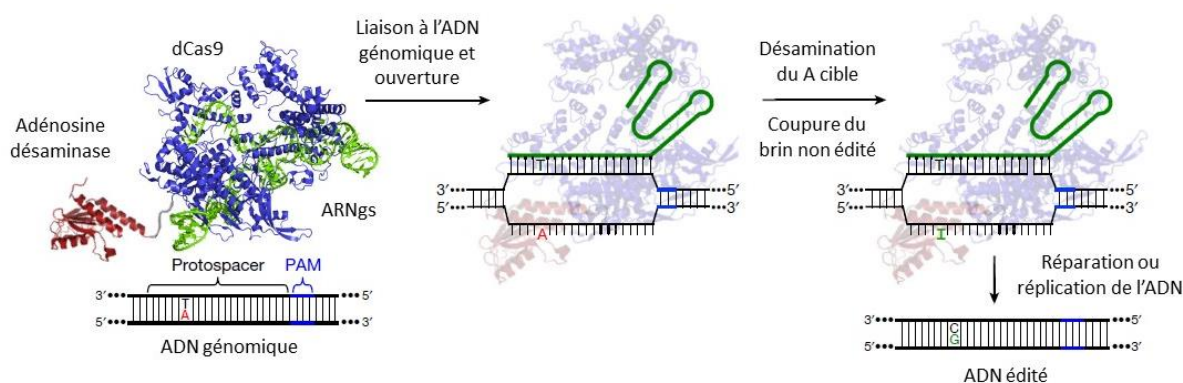
**Figure 15. Mode de fonctionnement de la cytidine désaminase**

La Cas9 désactivées (dCas9) est liée à un groupe cytidine désaminase permettant d'éditer l'ADN. Un PAM permet de cibler un endroit précis dans le génome pour procéder à la conversion du C en T. Le complexe dCas9-Cytidine désaminase se lie ensuite à l'ADN et induit l'ouverture de l'ADN. La désamination du C ciblé est ensuite réalisée et transformées en U par le UGI. Modifiée de Komor *et al.* 2016.<sup>93</sup>



Il existe actuellement deux types de ces protéines, *S. pyogenes* et *S. aureus*, qui se différencient par le type de bactérie duquel elles proviennent et par la séquence du PAM qu'elles utilisent.<sup>93; 147; 148</sup> L'un des désavantages de cette méthode est le fait que tous les C à l'intérieur d'une fenêtre de 4 à 8 nucléotides courent le risque d'être édités, ce qui pourrait alors induire de nouvelles mutations pouvant avoir d'importantes répercussions sur les protéines produites.<sup>148</sup> Komor *et al.* ont publié récemment leur découverte de la quatrième génération d'éditeurs de bases pour laquelle ils ont amélioré l'efficacité.<sup>149</sup>

En 2017, une autre forme d'édition de base a fait son apparition dans le monde scientifique. Gaudelli *et al.* ont présenté la technologie dérivée de CRISPR/Cas9 permettant la conversion des mutations de type A/T en C/G en utilisant un éditeur des adénosine.<sup>94</sup> Pour fonctionner, la technique requiert une adénosine désaminase couplée à un ARNg et une dCas9 permettant de réaliser cette conversion de l'adénine (A) en utilisant, cette fois, un intermédiaire sous forme d'inosine (I) lors de la désamination du A, tel qu'illustré dans la Figure 16.<sup>150</sup> Le I a des propriétés similaires à la guanine (G), expliquant pourquoi il sera lu comme un G lors de la traduction de l'ARNm en protéine. Le projet de recherche de Gaudelli a permis de démontrer l'efficacité de plusieurs éditeurs des adénosine différents, certaines permettant de corriger près de 50% des mutations, sans induire de mutations hors-cibles<sup>94</sup>.

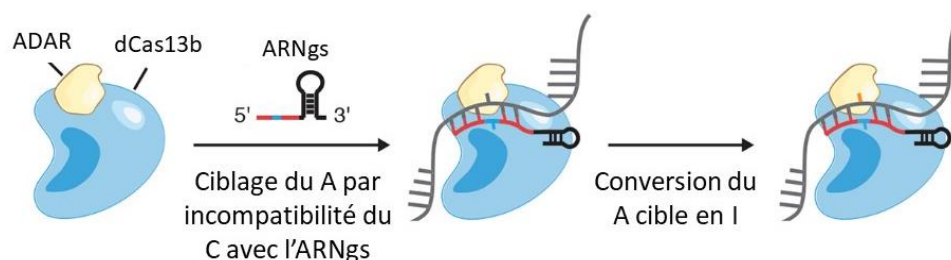


**Figure 16. Mode de fonctionnement des éditeurs d'adénosines**

La Cas9 désactivée (dCas9) est liée à une adénosine désaminase et l'ARNg pour former un complexe d'édition. Ce complexe se lie alors à l'ADN génomique, permettant l'ouverture des deux brins. La désamination du A cible est réalisée pour en faire une inosine (I), l'intermédiaire permettant par la suite la réparation en guanine (G) lors de la réplication de l'ADN. Modifiée de Gaudelli *et al.* 2017.<sup>94</sup>



De récents projets de recherche ont permis de concevoir une technologie, dérivée du CRISPR/Cas9 original, qui permet l'édition de l'ARNm.<sup>145</sup> Cette version implique l'utilisation d'une Cas13, une enzyme découverte également chez les bactéries.<sup>151</sup> Elle fait partie des CRISPR/Cas de type VI, regroupant trois sous-types (A, B et C), possédant deux domaines HEPN (de l'anglais *Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotides binding*) permettant l'édition de l'ARNm.<sup>152; 153</sup> Les recherches de Cox *et al.* ont démontré que le sous-type B est celui devant être privilégié pour éditer l'ARNm pour corriger les A mutés en G.<sup>145</sup> Le mécanisme permettant l'édition de l'ARNm est détaillé à la Figure 17 et comporte quelques similitudes avec les éditeurs d'adénosines utilisés pour l'ADN. L'édition de l'ARNm nécessite ainsi l'utilisation d'une enzyme adénosine désaminase agissant sur l'ARNm (de l'anglais *Adenosine deaminase acting on RNA* : ADAR) couplée à une Cas13b désactivée (dCas13b). L'ajout d'un ARNg permet de cibler le A par la détection de l'incompatibilité avec la cytidine C de l'ARNgs. Par la suite, l'ADAR peut procéder à la conversion A en I, qui sera alors reconnu comme un C dans la séquence, menant à la correction de la mutation puisqu'un G sera lu pour produire la séquence de l'ADN.<sup>145</sup> Le mécanisme est illustré à la Figure 17. Pour permettre l'utilisation de cette technologie comme approche thérapeutique efficace et permanente, il faudrait l'administrer de manière répétitive.<sup>154</sup>



**Figure 17. Mode de fonctionnement de la Cas13**

Un ARNg permet de guider la de complexe CRISPR/Cas13-ADARR et cibler le A qui doit être édité. L'enzyme ADAR procède ensuite à la conversion du A muté en I qui sera reconnu comme un G dans la séquence, lorsque transcrit en ARNm. Modifiée de Cox *et al.* 2017.<sup>145</sup>

### 3.5.3. Applications de la technologie de CRISPR/Cas9

Depuis l'apparition de la technologie CRISPR/Cas9, plusieurs chercheurs ont décidé de réaliser des projets de recherche pour modifier l'ADN. Plus de 6 000 études utilisant CRISPR/Cas9 sont recensées dans les moteurs de recherche comme *PubMed*, comparativement à moins de 20 études utilisant l'édition par la Cas13. Les équipes de recherche ont travaillé sur l'utilisation de la technologie de CRISPR/Cas9 pour diverses maladies souvent rares comme les épidermolyses bulleuses. Ainsi, les équipes de Hainzl *et al.*<sup>155</sup> et Webber *et al.*<sup>37</sup> ont toutes deux travaillé sur la EBDR. La première équipe a réalisé des transplantations de kératinocytes corrigés sur des souris, ce qui a permis de démontrer que CRISPR/Cas9 est un traitement potentiel *ex vivo* pour des maladies dermatologiques.<sup>155</sup> La publication de l'équipe de Webber démontre de son côté que le couplage des technologies d'édition du génome comme CRISPR/Cas9 avec les cellules souches pluripotentes induites permettrait de réaliser des greffes sur les patients à partir de leurs propres cellules corrigées génétiquement.<sup>37</sup> Également, en 2017, Kocher *et al.* ont utilisé un système impliquant deux enzymes pour induire une coupure dans l'ADN et remplacer la portion causant la maladie dans le gène *KRT14*. Dans leur étude, ils se sont intéressés à la correction d'une mutation causant l'EBS-gensev.<sup>79</sup>

La dystrophie musculaire de Duchenne est une rare maladie neurodégénérative causée par une mutation dans le gène codant pour la dystrophine, pour laquelle l'édition génétique a été utilisée.<sup>156-159</sup> Par exemple, l'équipe de Nelson *et al.* a utilisé CRISPR/Cas9 sur le gène de la dystrophine, dont une mutation entraîne une dégénération des muscles, une perte de mobilité et le décès prématuré.<sup>156</sup> Ils sont parvenus à corriger le gène de sorte à permettre la production normale de la dystrophine dans les myofibrilles et ainsi d'augmenter la force musculaire,<sup>156</sup> ouvrant ainsi la voie à une thérapie génique pour cette maladie.<sup>158; 160</sup>

La maladie de Huntington est également causée par une mutation dans le gène HTT. L'équipe de Yang *et al.* a tenté de corriger une mutation dans ce gène par l'utilisation de la technologie de CRISPR/Cas9. Leur projet a permis de corriger la mutation et de surcroît d'éliminer la toxicité d'une molécule au cerveau de façon permanente.<sup>161</sup>

D'autres maladies affectant le cerveau, comme la maladie d'Alzheimer, pourraient voir l'utilisation de CRISPR être utile, bien que son application soit rendue complexe par le fait que la maladie ne semble pas toujours être d'origine génétique.<sup>162; 163</sup> L'ataxie de Friedrich, une autre maladie neurodégénérative, fait également l'objet de projets de recherche en cours impliquant l'édition du génome, dont celui de Vannocci *et al.* utilisant CRISPR/Cas9 pour modifier l'exon 4 du gène *FXN*, démontrant ainsi que la technologie peut être utilisée dans le contexte de cette maladie.<sup>164</sup>

## 4. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

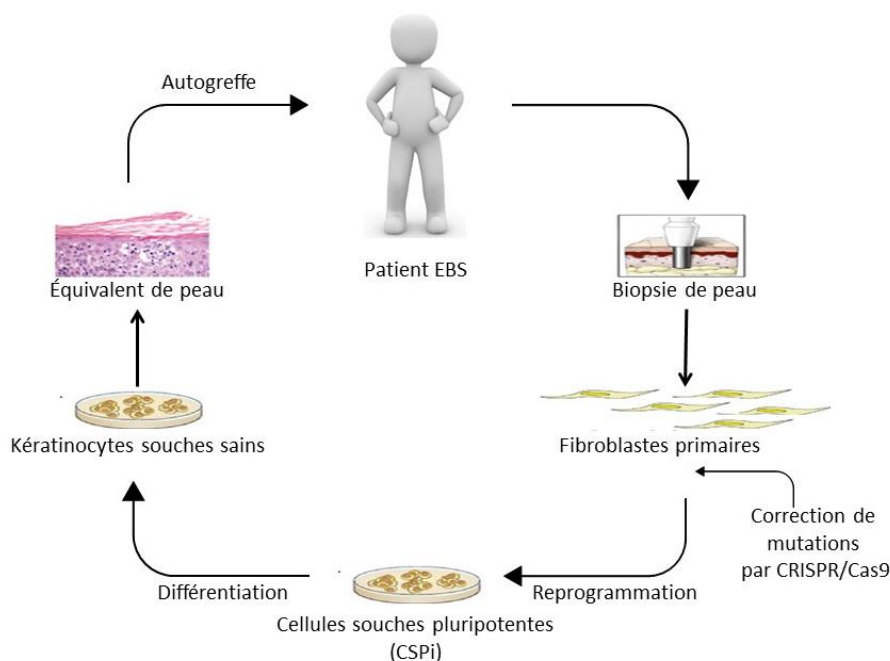
L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) est une maladie dermatologique pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif. Le projet présenté dans ce mémoire utilise la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 pour trouver une solution efficace et permanente pour soulager les patients atteints de la maladie. Le projet de recherche présenté fait partie d'un programme de recherche ayant pour objectif de trouver une thérapie génique pour le traitement de l'EBS. Dans cette section sera présenté le projet de recherche dans lequel s'insère ce projet de maîtrise, de même que les objectifs concrets du projet.

### 4.1. Contexte : Correction génétique avec CRISPR/Cas9

Depuis plusieurs années maintenant, la professeure-chercheure Catherine Laprise de l'Université du Québec à Chicoutimi réalise des projets de recherche portant sur l'EBS. L'investigation en cours comporte différentes étapes, dont certaines constituent ce projet de maîtrise. La Figure 18 constitue une représentation schématisée du projet en entier. Le recrutement de patients atteints des différentes formes d'EBS a eu lieu entre 2008 et 2013. Les patients proviennent majoritairement de la région du Saguenay–Lac-St-Jean. Un prélèvement sanguin et des biopsies cutanées de chacun des patients ont été réalisées lors du recrutement afin de constituer une banque de tissus et de cellules issues de biopsies cutanées. Des personnes non atteintes d'EBS ont également été recrutées pour servir de groupe témoin. Ils ont été jumelés pour l'âge et le sexe avec les patients EBS. Certaines des biopsies ont été utilisées pour cultiver des fibroblastes primaires, un type de cellules retrouvées dans la peau. Les mutations causant l'EBS chez chacun des patients ont été déterminées dans un projet réalisé au sein de l'équipe.<sup>80</sup> Dans ce programme de recherche, une des avenues envisagées est de faire la correction des mutations causales dans le génome des cellules de patients par l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 en utilisant un ADN donneur double ou simple brin. Les fibroblastes primaires ainsi corrigés seront reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (CSPi) à l'aide de virus Sendai produisant les facteurs de reprogrammation. Ensuite, ces CSPi seront différenciées en kératinocytes sains par l'utilisation de la *bone morphic protein* et de l'acide rétinoïque. La dernière étape de ce projet consiste à utiliser ces nouveaux kératinocytes sains pour synthétiser des équivalents de peau

en laboratoire pour procéder à des autogreffes chez les patients. Cela permettra de diminuer les risques de rejet de la greffe puisqu'il s'agit des cellules des patients modifiées.

Avant de procéder aux premiers essais de la méthode sur les cellules issues de biopsies cutanées, il a été convenu d'optimiser le protocole d'édition du génome sur des cellules commerciales, des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293T). Ces cellules ont été sélectionnées puisqu'elles étaient disponibles au laboratoire, mais également puisque les cellules HEK293T sont relativement faciles à transfecter, c'est-à-dire qu'il est simple de faire entrer du matériel génétique exogène à l'intérieur de leurs noyaux.<sup>165</sup> Comme il a été expliqué dans le chapitre précédent, la technologie CRISPR/Cas9 est maintenant utilisée pour la correction de mutations en induisant de la recombinaison homologue (RH), utilisant un ADN donneur double ou simple brin. Dans ce projet de recherche, on tente de faire de la RH en utilisant les deux types d'ADN donneur.



**Figure 18. Représentation générale du projet menant à la correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simple par CRISPR/Cas9**

Le recrutement de patients atteints de l'épidermolyse bulleuse simple a permis la réalisation de biopsies cutanées afin d'obtenir des fibroblastes primaires. Ces fibroblastes primaires verront ensuite leur mutation corrigée par la technologie CRISPR/Cas9 et un ADN donneur pour induire de la recombinaison homologue. La reprogrammation des fibroblastes corrigés permettra la production de cellules souches pluripotentes induites qui permettront par la suite d'obtenir des kératinocytes souches sains en les différenciant. Ces derniers pourront alors être utilisés pour la synthèse d'équivalents de peau permettant des autogreffes chez les patients.

## 4.2. Objectifs et hypothèses

L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) est une maladie dermatologique pour laquelle aucun traitement n'est disponible actuellement. Les essais réalisés jusqu'à maintenant n'ayant pas produit de résultats concluants, l'avenir pour le traitement de ce genre de maladie réside donc dans l'utilisation dans les technologies d'édition du génome. **L'objectif du projet est d'optimiser la technologie CRISPR/Cas9 pour induire une modification génétique par recombinaison homologue en utilisant des fragments d'ADN donneur double et simple brin.** Plus spécifiquement, les objectifs sont de:

1. Démontrer la présence d'une coupure double brin dans l'ADN induite par la coupure par la protéine Cas9;
2. Démontrer la présence de recombinaison homologue lors de l'utilisation d'ADN donneur double brin contenu dans un vecteur et un ADN simple brin;
3. Démontrer que la technique peut être utilisée autant dans les cellules commerciales que dans les fibroblastes primaires de patients atteints d'EBS.

Pour la majorité des ARN guides simple brins à l'étude, la coupure dans le double brin d'ADN sera induite. La modification de l'ADN et sa réparation par recombinaison homologue dans les cellules commerciales et dans les fibroblastes primaires des patients seront réalisées.

## **CHAPITRE I: CRISPR/Cas9-homologous recombination strategy for the correction of Epidermolysis Bullosa Simplex mutations**

### **Avant-propos**

Ce chapitre contient les principaux résultats du projet sur l'utilisation de CRISPR/Cas9 pour la correction génétique de mutations causant l'EBS chez deux patients atteints de la maladie. Cette méthode d'édition du génome a été appliquée en premier lieu, sur une lignée de cellules commerciales, soit les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293T), pour valider la méthode de correction. Par la suite, les premiers essais ont été réalisés sur les fibroblastes primaires des deux patients. Deux variantes de la méthode CRISPR/Cas9 ont été utilisées, soit un ADN double brin contenu dans un vecteur, et un ADN simple brin afin de procéder à la correction par recombinaison homologue (RH).

Les résultats démontrent que la protéine Cas9 est en mesure d'induire la DSB dans les deux types de cellules étudiées, mais son efficacité est plus grande dans les fibroblastes primaires. La présence de HDR lors de l'utilisation de la méthode CRISPR/Cas9 dans les cellules HEK293T a été démontrée, autant lors de l'utilisation d'un ADN double brin que simple brin. Toutefois, les résultats ne sont pas aussi concluants dans les fibroblastes puisque la quantité de HDR demeure très faible par rapport aux résultats obtenus pour les HEK293T.

Ce chapitre est sous forme d'article qui a été soumis le 16 mai 2019 dans le journal *Investigative Journal of Dermatology*. Catherine Laprise a dirigé l'ensemble du projet et est à l'origine du programme de recherche sur l'EBS. Catherine Laprise, Mbarka Bchetnia et moi avons contribué au profil méthodologique du présent projet. Mbarka Bchetnia et moi avons réalisé les manipulations en lien avec celui-ci. L'analyse des données et la rédaction de l'article ont été réalisés par Mbarka Bchetnia et moi-même à titre de co-première auteure. Catherine Laprise a révisé et dirigé l'ensemble des étapes incluant la planification du contenu du manuscrit. Jacques P. Tremblay du Centre de recherche du Centre hospitalier Québec-Université Laval, et Lucie Germain, du Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval (LOEX) ont donné leur avis scientifique et prodigué leurs conseils pour permettre l'avancement de ce projet de recherche, en plus de contribuer à la révision de

l'article. Le recrutement et l'évaluation des patients ont été réalisés par les docteurs Charles Morin et Audrey Dupérée du Centre intégré universitaire de santé et des services sociaux du Saguenay–Lac-St-Jean, ainsi que les docteurs Catherine McGuaig et Julie Powell, du Centre Mère-Enfant du Centre hospitalier universitaire Ste-Justine. La professeure-chercheure Catherine Laprise a dirigé toutes les étapes menant à la soumission du manuscrit en plus d'obtenir le financement requis pour soutenir ce projet de recherche.



**Title:** CRISPR/Cas9-homologous recombination strategy for the correction of Epidermolysis Bullosa Simplex mutations

**Authors:** Mbarka Bchetnia<sup>\*1</sup>, Lindsay Girard<sup>\*1</sup>, Julie Powell<sup>2</sup>, Charles Morin<sup>3</sup>, Catherine McCuaig<sup>2</sup>, Audrey Dupérée<sup>2</sup>, Joël Rousseau<sup>4</sup>, Antoine Guyon<sup>4</sup>, Lucie Germain<sup>5</sup>, Jacques P. Tremblay<sup>4</sup>, Catherine Laprise<sup>1</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Université du Québec à Chicoutimi, Département des sciences fondamentales, Saguenay, Canada; <sup>2</sup>CHU Ste-Justine Mother and child University hospital center, Montréal, Canada; <sup>3</sup>Centre intégré universitaire de santé et des services sociaux du Saguenay-Lac-St-Jean, Saguenay, Canada; <sup>4</sup>CHU de Québec Université Laval Research Center, Québec, Canada; <sup>5</sup>Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'université Laval/LOEX, Université Laval, Québec, Canada.

\* These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to CL (Catherine.laprise@uqac.ca)

Chicoutimi, Québec, Canada

Corresponding author:

Catherine Laprise Ph.D.

Université du Québec à Chicoutimi

P4-2150, 555, boulevard de l'Université

Saguenay (Québec) G7H 2B1

Tel (418) 545-5011 poste 5659

Fax (418) 615-1203,

Email address: [Catherine.laprise@uqac.ca](mailto:Catherine.laprise@uqac.ca).

**Short title:** Gene editing for epidermolysis bullosa simplex

## Résumé

La découverte de CRISPR/Cas9 en 2012 a apporté beaucoup d'espoir pour le traitement de nombreuses pathologies génétiques. Nous décrivons ici une approche impliquant l'édition spécifique du génome basée sur cette technologie pour restaurer deux mutations dominantes situées respectivement dans les gènes *KRT5* et *KRT14*. Les deux mutations ciblées sont responsables du phénotype généralisé sévère de l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS-gen sev). Notre approche thérapeutique est basée sur la sélection d'un ARN guide qui introduit un clivage dans les cellules primaires du patient près du lieu de la mutation et un ADN donneur remplaçant l'allèle mutée par une séquence de phénotype sauvage en induisant de la recombinaison homologue. Nous avons observé la présence d'un clivage dans l'ADN et l'incorporation d'ADN donneur par HDR plus élevée dans les cellules HEK293T comparativement aux fibroblastes primaires des patients. Cette étude décrit un protocole pour la réparation de mutations par le système CRISPR/Cas9 et la recombinaison homologue. De plus, il s'agit d'une preuve comme quoi l'édition du génome peut être utilisée en thérapie clinique et peut être utilisée comme thérapie pour l'EBS et d'autres maladies monogéniques. Ce travail relate également les défis associés à l'utilisation de cette technique, de même que les avenues futures de cette approche.

## Abstract

The discovery of the CRISPR/Cas9 system, in 2012, raised hope for the treatment of many genetic pathologies. We describe here a specific gene editing approach based on this technology to restore two dominant point mutations within *KRT5* and *KRT14* genes respectively. The two target mutations are responsible for the generalized severe epidermolysis bullosa simplex phenotype (EBS-gen sev). Our therapeutic method is based on a chosen single guide RNA that introduces DNA cleavage in patient's primary cells close to the mutation site and a donor DNA template that replace the mutant allele with a wild type sequence by directed homologous recombination (HDR). We observed successful cleavage of DNA and higher rates of DNA donor incorporation by HDR when using HEK293T cells compare to primary patient's cells. Our study describes a protocol for a simple model for point mutation repair directed by CRISPR/Cas9 system and HDR. Moreover it provides a proof-of principle that gene editing has clinical therapeutic prospects and could be used to

cure EBS and other monogenic diseases in a heritable and precise manner. We also highlight, in this work, the associated challenges and future avenues of this approach.

## Introduction

Epidermolysis bullosa simplex (EBS) is a rare genetic disease with a prevalence estimated to be approximately 6 to 30 per 1 million live births.<sup>166</sup> Mutations in *KRT5* and *KRT14* genes are responsible for approximately 75% of EBS cases<sup>167</sup> and disease severity depends on the mutation location within these two genes.<sup>168,169</sup> The keratin proteins encoded by *KRT5* and *KRT14* genes are expressed in keratinocytes within the basal layer of the epidermis. Defect of one of these two keratins leads to collapse of the keratin intermediate filaments network resulting in aggregates that accumulate in the periphery of the keratinocyte cytoplasm.<sup>170</sup> This impairs cellular stability and results in cytolysis even upon minor mechanical trauma, thereby leading to bubble appearance.<sup>171</sup>

Even though several potential attempts to cure EBS were initiated and are under development, treatment for EBS is still largely limited and the care is primarily palliative, focusing on disease management to improve the patient's quality of life.<sup>172</sup> In 2013, Wally *et al.* observed that the proinflammatory interleukin 1 $\beta$  is constitutively activated in EBS cells and tried to disrupt its expression by application of the small molecule diacerein. This resulted in a clinically meaningful reduction of blisters in a pilot and a phase 2/3 clinical trial.<sup>173,174</sup> Chaperone molecules as trimethylamine N-oxide were also tested *in vitro* and showed a significant reduction of keratin aggregates on EBS patients cells.<sup>175,176</sup> The inconvenient of these two small molecules is that they provide only a transient effect on blister reduction. Aushev *et al.* (2017) and Peking *et al.* (2018), from the same research team, used spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing (SMaRT) to correct a mutation within *KRT14* gene at the transcriptional level. Once again the corrective effect is reversible, requiring a continuous repetition of the treatment. Moreover, this treatment was performed on immortalized and not primary EBS cells.<sup>177,178</sup> These reports highlight a real need for the development of better treatments addressing the underlying genetic defects.

In the last years, emerging genome-editing strategies, able to modify the genome of disease affected cells, have shown therapeutic potential for the treatment of monogenic disorders and can be an attractive alternative for the treatment of EBS. Among them is the *clustered regularly interspaced palindromic repeats CRISPR/Cas9* (CRISPR/Cas9) genome editing technology. It is modified from a naturally occurring bacterial defense mechanism.<sup>89</sup> The Cas9, an RNA-directed DNA endonuclease induces a DNA double strand break (DSB), which activates the cell's endogenous repair machinery. This leads to genomic modifications either by non-homologous end joining (NHEJ) or by homology-directed repair (HDR).<sup>92</sup> With the NHEJ process, the DNA ends are ligated but there are small insertions or deletions or a variable number of nucleotides at the ligation site. With the HDR process, a donor DNA containing sequences homologous to those adjacent to the DSB are incorporated into the cell DNA. This enables the introduction of desired changes in the genome, ranging from one single nucleotide to large insertions or replacements thereby leading to precise DNA modifications at a target region.<sup>179,180,181</sup> The edited genotype realized with the CRISPR/Cas9 system is permanent and precise.<sup>182</sup> A recent report showed the correction of a causal hot spot mutation within *KRT14* by combining a double nicking method and HDR, but it was done on immortalized EBS keratinocytes.<sup>183</sup>

In the present study, we apply CRISPR/Cas9-triggered HDR approach to repair two single point mutations responsible of severe EBS phenotype (EBS-gen sev). The gene modifications were made in HEK293T cells and in two EBS patient fibroblasts. Although higher percentages of HDR were observed in HEK293T cells, cleavage of DNA and gene corrections were also obtained in the patient primary cell cultures.

To our knowledge, this is the first report of a causal gene correction by gene editing for EBS in patient primary fibroblasts.

## **Material and Methods**

### CRISPR/Cas9 sgRNA design and cloning in expression vector

Six sgRNAs, targeting sequences located in the *KRT5* and *KRT14* genes upstream or downstream of the mutation site, were designed using the website <http://crispr.mit.edu> and

ordered from IDT (Integrated DNA Technology Inc., Coralville, IA) (**Figure 19, Figure 20**). The selected sgRNAs were cloned into the plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene plasmid #62988) following Zhang's laboratory protocol.<sup>180</sup> Briefly, the plasmid PX459 was linearized using the BsaI restriction enzyme (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) and the sgRNAs of interest were then cloned into the BsaI site using T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) followed by a transformation in DH5 $\alpha$  competent bacteria according to the manufacturer protocol. Clones were amplified in liquid LB and plasmid DNA extraction was performed using the EZ-10 Spin Column Plasmid DNA mini-prep (BioBasics Inc., Markham, ON, Canada). To confirm the insertion of sgRNA in PX459 vector, clones were sequenced by the Sequencing and Genotyping Platform Genome CHUL/CHUQ (Quebec City, QC, Canada). The sequencing profiles were analysed with BioEdit software.

#### Donor DNA template

##### a) Double strand DNA into a plasmid

The donor sequence double strand DNA (dsDNA) was comprised of left (5'arm) and right (3'arm) DNA fragments of homology that were assembled by amplification from the human genome into the plasmid HR410PA-1 Gene Knock-out Targeting Vector [MCS1-EF1 $\alpha$  -GFP-T2APuro-pA-MCS2] (System Biosciences Inc., Pao Alto, CA). The 5' homology arm was cloned into the donor plasmid at the NsiI and BglII sites. The 3' homology arm was then included into the donor plasmid at the BamHI and SalI sites. The 5' homology arm contained the corrected target mutation. **Figure 21** represents the schematic of strategy used for CRISPR-mediated correction of the target mutation within *KRT5*. A similar strategy was used for the mutation within *KRT14*.

##### b) Single strand DNA

Our single strand DNA (ssDNA) design was performed according to Richardson *et al.* 2016.<sup>184</sup> These researchers proposed a donor sequence of 128 bp that needs to be 92 bp upstream and 36 bp downstream the cut site of the Cas9 and is complementary to sgRNA sequence. The donor ssDNA also needs to contain the corrected mutation and an inserted silent polymorphism to detect incorporation of ssDNA into the cell DNA. Following these

criteria, two ssDNA donor sequences were chosen: one was 127 nucleotides long and specific for the c.449T>C (L150P) mutation in *KRT5* and the second was 133 nucleotides long and specific for the c.373C>A (R125S) mutation in *KRT14* (**Figure 22**). Both ssDNA donor sequences were synthesized as 4 nmole Ultramers DNA Oligo by IDT (Integrated DNA Technology Inc., Coralville, IA) and two phosphonothioate bonds were added to each extremity to stabilize them.

#### Cells culture and transfection

HEK293T cells were maintained in growth media containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum and 50 IU/mL penicillin-streptomycin and cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. HEK293T cells were transfected using JetPRIME transfection reagent (Polyplus-Transfection Inc., NY) according to the manufacturer protocol and using 1 µg of SpCas9/sgRNA expression plasmid PX459 and 0.5 µg of donor DNA either dsDNA or ssDNA.

Primary EBS fibroblasts were derived from two minimally punch biopsy from two EBS patients, one carrying the c.449T>C (L150P) mutation within the *KRT5* and the second carrying the c.373C>A (R125S) mutation within the *KRT14*. Primary fibroblasts were cultured in the same medium and conditions as the HEK293T cells. 2 X 10<sup>5</sup> primary fibroblasts were electroporated with 1 µg of each of the SpCas9/sgRNA PX459 expression plasmid and 2 µg of the donor plasmid or 1 µg of the ssDNA using the Neon Transfection System (ThermoFischer Scientific Inc., Waltham, MA) with 1500 V, 20 ms pulse width, 1 pulse<sup>185</sup>. Transfection efficiency was evaluated by GFP expression using flow cytometry (flow cytometer analysis Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Midland, ON, Canada). Selection of the gene-edited cells was done 24 hours post transfection by puromycin antibiotic selection for minimum 72 hours.

#### Surveyor nuclease assay

Genomic DNA was isolated after puromycin antibiotic selection and PCR fragments of 600-900 bp were amplified followed by heteroduplex formation and incubation with the

Surveyor nuclease (Integrated DNA Technology, Coralville, IA) and resolved on 12% Tris borate EDTA polyacrylamide gel at 200 V for 1 h.

#### Homologous Recombination analysis

When donor DNA template was a dsDNA, genomic DNA was isolated from gene edited cells and analysed for the presence of HDR by PCR amplification using an inside-out PCR that exclude the amplification of the donor plasmid. A primer was inside the donor cassette plasmid and the other primer in the cell DNA and outside the homology arm. PCR fragments were migrated on 1.5% agarose gel and sequenced by the Sanger method to confirm HDR.

When donor DNA template was an ssDNA, an amplification of a short region of <700 bp comprising the Cas9 target followed by Sanger sequencing was performed for transfected HEK293T. For transfected EBS fibroblasts, deep sequencing using primers allowing the amplification of PCR products of a maximum of 350 bp was performed. Samples were then sent for sequencing to the Next-Generation Sequencing platform of McGill University (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Canada) and analysed using the visualization tool Integrative Genomics Viewer (IGV).<sup>186</sup>

#### Off target sites prediction

To predict the most likely off target sites of our sgRNAs, we used public web servers (<http://crispr.mit.edu> and <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). sgRNA sequences were blasted against the genome in order to identify potential off target sites.

## **Results**

#### Double strand break induction

To correct the two heterozygous mutations, c.449T>C (L150P) and c.373C>A (R125S) within *KRT5* and *KRT14* genes respectively and responsible of the EBS severe phenotype, we selected three sgRNA sequences for each mutation (those with better score and a minimum of off-target) and we evaluated their functional activity to guide Cas9 to induce DSBs at the target position close to the mutation. HEK293T cells were transfected

with SpCas9/sgRNA expression plasmid and flow cytometry analysis was made to evaluate the percentage of transfected cells, which was about 70%. Analysis of 600-900bp fragments with Surveyor nuclease was made to evaluate cleavage efficiency of the SpCas9/sgRNAs combinations at the desired locations within *KRT5* and *KRT14* genes. The expected DNA fragment sizes were observed confirming that selected sgRNAs conducted the Cas9 at the right target. As an example, when HEK293T were transfected by SpCas9/K14sgRNA1, observed bands were of 639bp and 137bp, when transfected by SpCas9/K14sgRNA2, bands were of 418bp and 358bp and when transfected by SpCas9/K14sgRNA3, bands were of 638bp and 583bp (**Figure 23**). Cas9 cleaved the DNA creating DSBs that were corrected by NHEJ by the cellular DNA reparation machinery. This was confirmed by the software program Tracking Indels by Decomposition (TIDE). Analyses of sequences by TIDE showed NHEJ indel occurrence of up to 50.7% for SpCas9/K5sgRNA1, 55.0% for SpCas9/K5sgRNA2 and 44.0% for SpCas9/K5sgRNA3. For sgRNAs of *KRT14*, NHEJ was up to 62.9% for SpCas9/K14sgRNA1, 53.9% for SpCas9/K14sgRNA2 and 12.0% for SpCas9/K14sgRNA3 ( $p < 0.05$ ) (**Figure 24**). The fibroblasts derived from two patients were confirmed to be heterozygous for the cited mutations and an up to 40% electroporation efficiency was achieved. As in HEK293T cells, the functional activity of sgRNAs was confirmed by TIDE and was up to 90% for SpCas9/K5sgRNA1, SpCas9/K5sgRNA2 and SpCas9/K5sgRNA3. For sgRNAs of *KRT14*, NHEJ was up to 30% for SpCas9/K14sgRNA1, 11.5% for SpCas9/K14sgRNA2 and 4.3% for SpCas9/K14sgRNA3 ( $p < 0.05$ ) (**Figure 25**).

### HDR efficiency

To induce HDR in cells, we used, two donor DNA types: 1) a dsDNA in a plasmid containing a left homology arm and a right homology arm of up to 1000 bp both and flanking the GFP-T2A-Puro-PolyA expressing cassette or 2) a ssDNA containing the corrected single nucleotide mutation and an inserted silent polymorphism.

#### a) dsDNA in plasmid

When the donor DNA was a dsDNA, HEK293T cells were co-transfected with SpCas9/sgRNA vectors and a donor DNA. A puromycin antibiotic selection was made to obtain a homogenous cell population expressing the puromycin gene because both vectors,



SpCas9/sgRNA and donor vector, contained a puromycin resistance gene. DNA was then extracted and HDR analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR). We used one primer contained into a part of the cassette of the donor vector, and the other on the outside of the homology arm in the cell DNA.<sup>187, 188</sup> PCR fragments of non-transfected HEK293T cells, transfected by SpCas9/sgRNAs plasmid, and co-transfected with SpCas9/sgRNA plasmid and the donor dsDNA were migrated on 1.5% agarose gel. Because of the specificity of the primers used for the PCR, only genomic DNA, which underwent HDR was amplified. We observed band profiles with the exact expected sizes only for cells co-transfected by SpCas9/sgRNA plasmid and the donor DNA confirming the presence of HDR. For example, for SpCas9/K5sgRNA1, bands were of 1.632 bp and 1.133 bp for 5'arm and 3'arm homology arms respectively and for SpCas9/K14sgRNA1 bands were of 1.563 bp and 1.366 bp respectively for 5'arm and 3'arm homology arms. HDR was also confirmed by Sanger sequencing. No band was observed in untreated cells or in cells transfected only by the SpCas9/sgRNA plasmid (**Figure 26**). In the case of primary fibroblasts, bands were of low intensity showing that HDR occurred in a low percentage of cells (data not shown).

#### b) ssDNA

To detect the incorporation of the donor ssDNA in the genomic DNA of cells co-transfected with SpCas9/sgRNAs and ssDNA, a silent one base pair mutation was added to the ssDNA resulting in a synonym polymorphism. For *KRT5*, the ssDNA was of 127 bp with a silent mutation (T>G) introduced at position 26 bp into the sequence. For *KRT14*, a sequence of 133 bp with a silent mutation (T>A) at position 4 bp introduced into the sequence was selected. Cells were then co-transfected with SpCas9/sgRNA plasmid and the ssDNA followed by DNA extraction. Sanger sequencing was performed, and sequences were analysed with BioEdit software. Results showed an homozygous wild type profile of the target polymorphism in untreated HEK293T cells and an heterozygote profile in HEK293T cells transfected by SpCas9/sgRNA plasmid and the ssDNA either for *KRT5* or *KRT14*. This indicated the successful incorporation of ssDNA in the cell genomic DNA (**Figure 27**). In the case of fibroblasts, deep sequencing showed a percentage of mutation correction by HDR enhanced by ssDNA of 7% for the L150P mutation and of 1.5% for the R125S mutation.

Taken together, our data indicate that whether a dsDNA or ssDNA donor is used, the percentages of HDR were always higher in HEK293T than in primary fibroblasts.

#### Off-Target analysis

We performed an *in silico* screen to identify putative off target sites that can be cut by SpCas9 within coding regions of the human genome for each sgRNAs. We searched the genome sites with a minimum of 14 consecutive nucleotides of shared identity. All the off targets were in non-coding regions. These data indicated a good safety profile for the selected sgRNAs.

#### **Discussion**

EBS is a skin disease caused by more than 200 mutations in *KRT5* and *KRT14*.<sup>177</sup> Devising efficient therapy for this disease is still lacking and remains a challenge because of the scarcity of the disease and the autosomal dominant transmission. Gene editing allows the possibility of efficiently modifying a genomic sequence by enabling targeted disruption, insertion, deletion, and correction in both *ex vivo* and *in vivo* experiments.<sup>189</sup> Several studies reported the adoption of this method to correct single point mutations responsible for genetic diseases including  $\beta$ -thalassemia,<sup>188,190</sup> Duchenne muscular dystrophy (DMD),<sup>191</sup> chronic granulomatous disease<sup>192</sup> and severe combined immunodeficiency (SCID).<sup>193</sup> The percentages of mutation correction were variable between these studies.

Single point mutation repair was also performed *in vivo* by Yin *et al.* 2014 using the CRISPR/Cas9-mediated HDR to correct a *Fah* gene point mutation responsible for the hereditary human disease tyrosinemia.<sup>194</sup> The injection of the CRISPR/Cas9 editing complex with the donor ssDNA into mice showed a successful precise mutation correction. Yang *et al.* (2016) also reported the correction of a point mutation responsible for hyperammonemia *in vivo* by intravenously infusing two separate adeno-associated virus (AAV) vectors expressing the CRISPR/Cas9 system and donor DNA into mice.<sup>195</sup> In another report, Bassuk *et al.* (2016) demonstrated the adoption of the CRISPR/Cas9 system to patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with X-linked retinitis pigmentosa to

precisely repair a point mutation. The obtained mutation correction rate *in vitro* was modest (13%).<sup>196</sup>

We aimed to correct two single point mutations responsible for EBS-gen sev by HDR in primary fibroblasts, reprogram them into induced pluripotent stem cells (iPSCs) and then differentiate them into keratinocytes. Gene repaired keratinocytes will serve to engineer skin tissue that will be transplanted to patients as autografts, which will potentially avoid the patient's immune system graft rejection. Here we present the findings of our *in vitro* experiments of gene editing of EBS primary fibroblasts. First, we tested the feasibility of CRISPR/Cas9 mediated genetic repair protocol in HEK293T cells. The results showed that the sgRNAs efficiently targeted the specific location and led to NHEJ. In the presence of donor DNA, our results showed that HDR was efficient in HEK293T cells but that the efficiency was lower in primary patient's fibroblasts. HDR efficiency was observed to be commonly low in the studies listed above.<sup>197</sup>

HDR works poorly because introducing a strand of "donor" DNA that has the correct base relies essentially on the cell endogenous repair machinery, which depends on the cell type (transformed or primary). The efficiency also depends on the cell state and the cell cycle stage, since HDR was reported to be more active in the S phase.<sup>198,199</sup> Moreover, the design of the donor template, such as the lengths of the homology flanking arms and the template type, might be closely related to the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated HDR for point mutations. In the studies reported to date, dsDNA as well as ssDNA donor templates have been used, however, the length and the injection method were variable. This is the reason why the low efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise gene editing remains a major challenge in generating cell lines or model organisms with the desired mutation or correcting genetic mutation for gene therapy of human inherited disorders. Cas9 orthologs, and other nucleases derived from class II CRISPR-Cas systems, have recently been developed to enhance HDR. Among them, Cpf1, a prominent CRISPR protein that requires a shorter RNA and generates a staggered cut, which could improve HDR, has been described.<sup>200</sup> The DNA ligase IV inhibitor Scr7 has also been shown to enhance HDR pathway,<sup>201</sup> However, the

function of Scr7 in promoting HDR is controversial since it did not significantly promote HDR in rabbit embryos.<sup>202</sup>

A research team recently observed that using CRISPR/Cas9 approach in p53-proficient cells resulted in a DNA damage response, which caused a growth disadvantage/arrest, and decreased HDR efficiency.<sup>203</sup> They demonstrated that inhibiting DNA damage signaling can increase the efficiency of HDR in normal, untransformed cells and suggested temporary p53 inhibition to promote precision genome editing.<sup>203</sup> However, we think this should be carefully considered as it would leave the cell transiently vulnerable to the introduction of chromosomal rearrangements or genomic modifications.

Another major significant hurdle to the therapeutic application of the CRISPR/Cas9 system is the potential for off target cleavages and safety concerns related to nuclease-associated off-target effects.<sup>204,205</sup> We therefore examined off target effects, we searched the genome sites with a minimum of 14 consecutive nucleotides of shared identity. All the sgRNA off-target sites were in non-coding regions and hence with no potential adverse effects.

In conclusion, this report is the first to describe an attempt to restore two of the most severe heterozygous mutations responsible for EBS using CRISPR/Cas9-mediated HDR. Our findings demonstrated the successful use of CRISPR/Cas9 induced HDR in HEK293T cells and we are pursuing *in vitro* optimisation of this method in primary EBS fibroblasts to achieve a good percentage of HDR and succeed to generate autografts for severe EBS phenotypes.

## Figures

	sgRNA sequence	PAM
K5sgRNA1:	5' – TTTGTGGACACGTTCTGAATTAGAC	TGGCAGCT –3'
K5sgRNA2:	5' – CCAGGGGGAGATAGGACACCTATCC	AGGGCACA –3'
K5sgRNA3:	5' – TCCTCGGTTCCTCACCCTCTGGATGC	TGGGGTCG –3'
K14sgRNA1:	5' – CCTATAGAGAAATCTTAAGGTCTCA	GGGGCCTG –3'
K14sgRNA2:	5' – CTTGTGCCCTACCTTCCAGCACAGG	AGGCAGCT –3'
K14sgRNA3:	5' – GTGGTGGCTTTGGTGGTGGCTTTGC	TGGTGGTG –3'

**Figure 19. Sequences of the selected sgRNAs**

Single guide RNAs used to target c.449T>C (L150P) mutation in KRT5 are K5sgRNA1, K5sgRNA2, and K5sgRNA3. K14sgRNA1, K14sgRNA2, and K14sgRNA3 are single guide RNAs used to target c.373C>A (R125S) mutation in KRT14. Each sgRNA contains a sequence of 20 nucleotide complementary to the DNA sequence of the targeted gene. Protospacer adjacent motif (PAM) consists of a NGG nucleotides sequence recognised by the SpCas9.

### a) KRT5

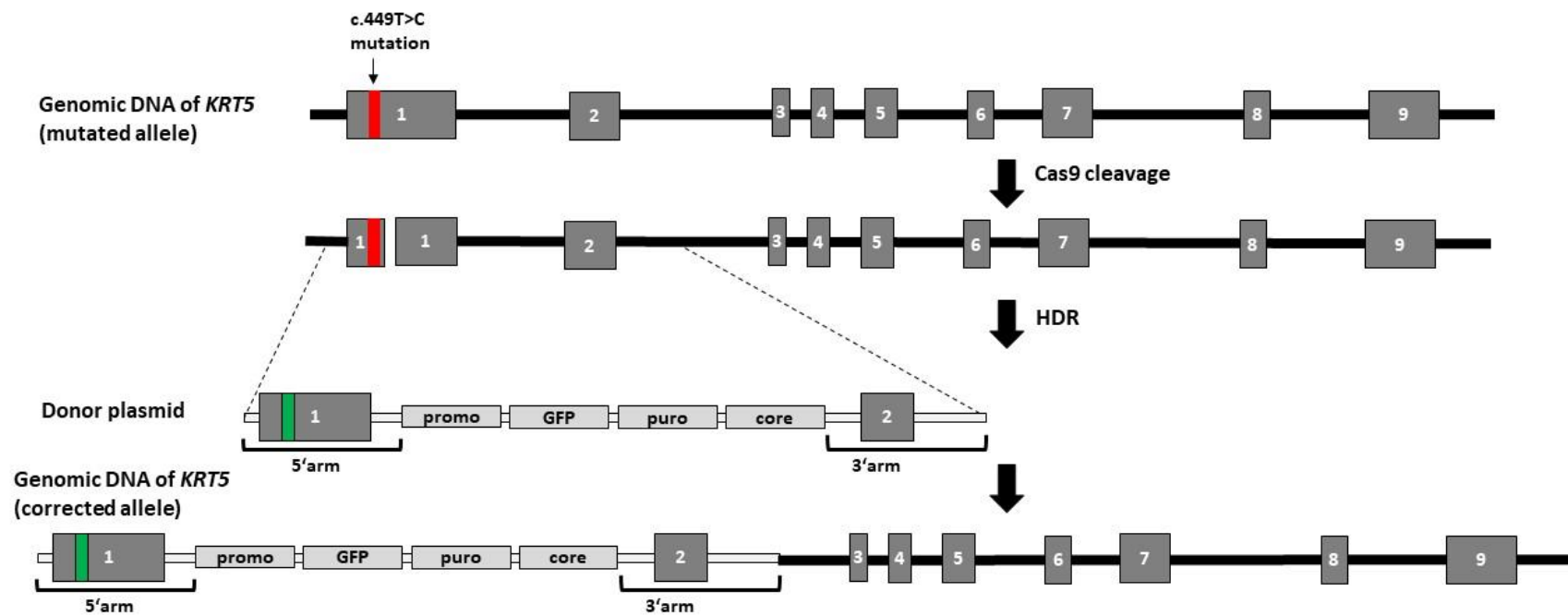
GTTTGGTGCTGGTCTGGAGGCGGCTATGGCTTTGGAGGTGGTGCCGGTAGTGGATTGGTTTCGGCGGTG  
GAGCTGGTGGTGGCTTTGGGCTCGGTGGCGGAGCTGGCTTTGGAGGTGGCTTCGGTGGCCCTGGCTTTCCT  
GTCTGCCCTCCTGGAGGTATCCAAGAGGTCACTGTCAACCAGAGTCTCCGACTCCCCTCAACCTGCAAAAT  
CGACCCCA<sup>GCATCCAGAGGGT</sup>GAGGACC<sup>GAGGAGCGCGAGCAGATCAAGACCCTCAACAATAAGTTTGCT</sup>  
CCTTCATCGACAAGGtgagctacgatcttttgtaaaaaatcactgtgggtctgaaataaatgccaaagaga  
gagaaagaaggaagatgttttggcctttgtgcaataacttttatagttgtacagttctgtgtttccgtttgt  
ttctgtgccctggatttgt<sup>ggacacgttctgaattagact</sup>ggcagctgggaagggaagaaattatttcttccc  
attcagagggttagctcacaaagggcctcttaacaactgttggacagagagatgaatttcagccatatataa  
aggggctgactgtacaggaaggttagacaagtgcattgggcagcagcctgagtgccctttgcagccaccctga  
gccgggacacactccaagcagcactcctagtgtttctgtgtccct<sup>ggataggtgtcctatctccc</sup>cctgga  
aaagtgagtttgggtgcctcagctctgcacctcccctcctggggcccaggccaggcacagtgcacagaaaa

### b) KRT14

TGTCTGTCTCATCCTCCCGCTTCTCCTCTGGGGGAGCCTGCGGGCTGGGGGGCGGCTATGGCGGTGGCTTC  
AGCAGCAGCAGCAGCAGCTTTGGTAGTGGCTTTGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTGTGGCTTGGG  
TGGT<sup>GGCTTTGGTGGTGGCTTTGC</sup>TGGTGGTGATGGGCTTCTGGTGGGCAGTGAGAAGGTGACCATGCAGA  
ACCTCAATGACAGCCTGGCCTCCTACCTGGACAAGGTGCGTGCTCTGGAGGAGGCCAACGCCGACCTGGAA  
GTGAAGATCCGTGACTGGTACCAGAGGCAGCGGCCTGCTGAGATCAAAGACTACAGTCCCTACTTCAAGAC  
CATTGAGGACCTGAGGAACAAGgtgggtgaatgggcagcagaaggcaccattccagctagctccttctggg  
aacaattcatgccccaggccc<sup>ctgagaccttaagatttctc</sup>tataggacagagtcacccccagatcccttc  
tttcgagggtcttggatgccctaagactgatcagtgagaagatgctttcccttccccagcctcctcatcccc  
ttctgatctcaaatcctcagaccatgtgagatcagtgattcctatccttacatttttagaggaagcagtt  
gaagcttcgagaggtgctgtgaccagctgcaggtcacatagcaaatatggcagagccaaggctggggcc  
cttgt<sup>gcccctaccttccagcacagg</sup>aggcagctacttgttctccagcacaggggaggagtgaggctcctaac  
gggaccaggcaagacatccaaaccactcattagctcactagctctgggctgtggctgccggcccccataagc  
cttggtacaggctggtccctccccacagccaggcgggcatggagagcctgcagagacaattagtggtggtcc  
cttgatgtgcctgcacagagagagcctggcaggccttgtgcctgactctagccccctc

**Figure 20. Location of the selected sgRNAs and sequences**

a) Single guide RNAs used to target c.449T>C (L150P) mutation in KRT5 are K5sgRNA1 highlighted in blue-green, K5sgRNA2 in red and K5sgRNA3 in pink. b) Single guide RNAs used to target c.373C>A (R125S) mutation in KRT14 are K14sgRNA1 highlighted in yellow, K14sgRNA2 in light blue and K14sgRNA3 in green. The nucleotide mutations are in red. Protospacer adjacent motifs are in light gray.



**Figure 21. Scheme strategy used for CRISPR-mediated HDR for the c.449T>C in KRT5**

Red rectangle denotes the target mutation at the genomic DNA, SpCas9 will create DSBs that will be repaired by HDR in the presence of wild type dsDNA donor DNA assembled into the plasmid HR410-PA-1. Green rectangle denotes the correction of the mutation.

a)

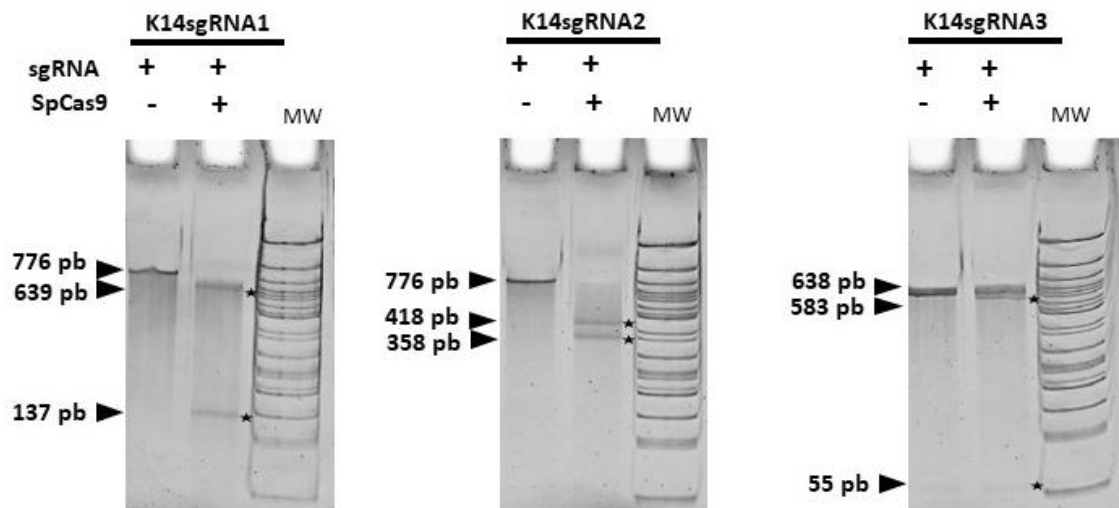
5'ggctttcctgtctgccctcctggagggatccaagaggtcactgtcaaccagagtctctgactccctcaacctgcaaatcgac  
ccagcatccagagggtgaggaccgaggagcgcgagcagatca3'

b)

5'cagagctcgcaccttgtccaggtaggaggccaggcgggtcattgaggttctgcatgggtcaccttctcactgccaccagaagccc  
atcaccaccaagcaagccaccaccaaagccaccaccaagccagcacca3'

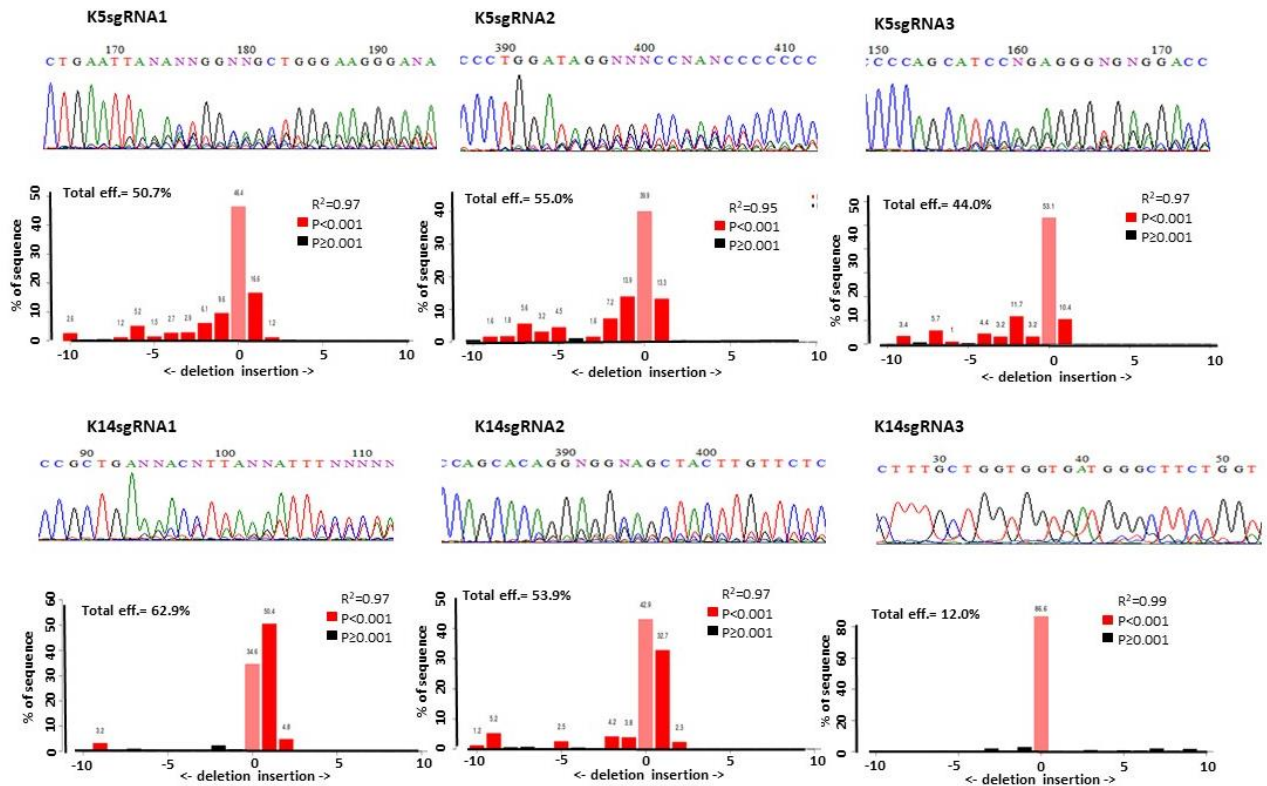
**Figure 22. Sequences of ssDNAs**

a) ssDNA specific for c.449T>C (L150P) mutation in *KRT5*. b) ssDNA specific for c.373C>A (R125S) mutation in *KRT14*. Sequences corresponding to the inserted silent polymorphism site are in red. Target mutations are highlighted in blue. SgRNAs are highlighted in yellow and PAMs in gray.



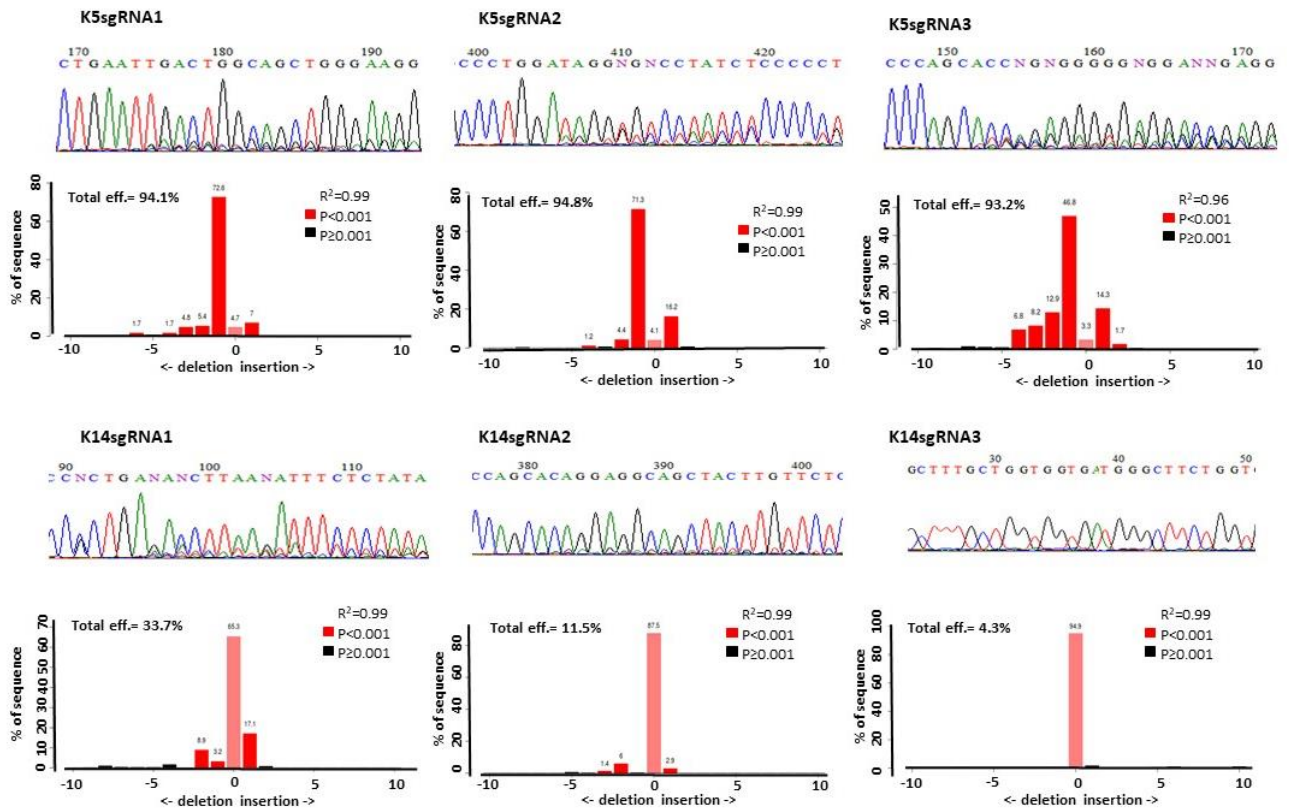
**Figure 23. Surveyor assay of *K14sgRNAs* mediated cleavage in *HEK293T* cells**

The *K14sgRNA*/Cas9 plasmid were transfected into *HEK293T* cells and the region of interest was amplified by PCR and submitted to a Surveyor assay. Digested PCR products were migrated in a 12% Tris borate EDTA polyacrylamide gel. Bands for the expected cleavage products were observed and are indicated by arrowheads in the figure. Untreated *HEK293T* cells were included as negative controls. MW: DNA marker of 50bp.

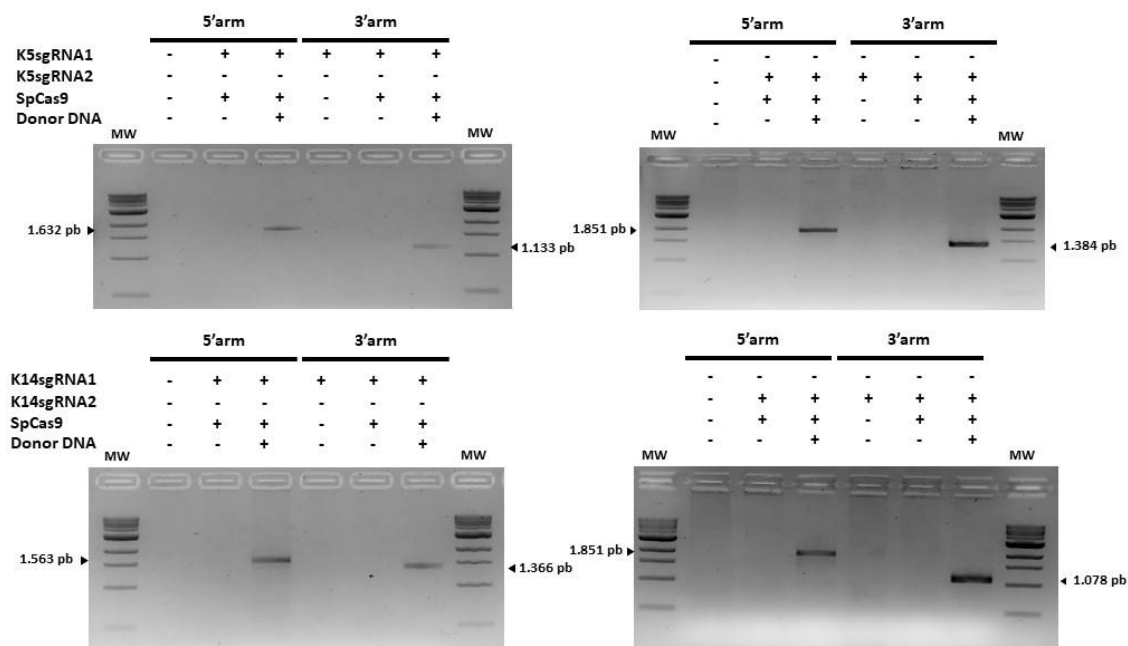


**Figure 24. Analysis of INDELs in HEK293T cells using the TIDE web portal**  
 TIDE is provided at <https://tide.deskgen.com>. The percentages of INDELs determined by this method demonstrated a high rate of INDELs validating the functional activity of the selected sgRNAs.



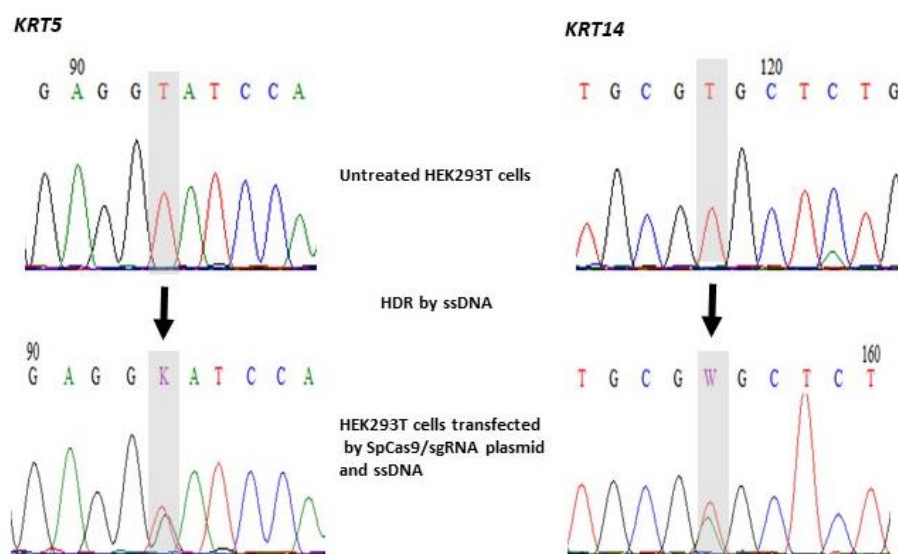


**Figure 25. Analysis of indels in primary fibroblasts using the TIDE web portal**  
 The rate of INDELs is high validating the functional activity of the selected sgRNAs in *KRT5* and *KRT14*.



**Figure 26. Site-specific homologous recombination mediated by dsDNA**

HEK293T cells were transfected by SpCas9/sgRNA plasmid and dsDNA. PCR analyses using specific primers with one in the plasmid cassette and the other in the *KRT5* gene outside the targeting construct to detect HDR showed the presence of bands at the expected size confirming the presence of HDR. No bands were observed when HEK293T cells were untreated or transfected only by SpCas9/sgRNA plasmid. MW: DNA marker of 1kb.



**Figure 27. Site-specific homologous recombination mediated by ssDNA**

HEK293T cells were transfected by SpCas9/sgRNA plasmid and ssDNA, sequence analysis of PCR products in 1.5% agarose gel showed the presence of an heterozygous profile at the position of the inserted polymorphism either in *KRT5* or *KRT14* comparing to untreated HEK293T cells that have an homozygous profile at this nucleotide. This confirms the ssDNA incorporation in the DNA cells.

## References

1. Sprecher, E (2010). Epidermolysis bullosa simplex. *Dermatologic clinics*, vol. 28: United States. pp 23-32.
2. Bolling, MC, Lemmink, HH, Jansen, GH, and Jonkman, MF (2011). Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *The British journal of dermatology* **164**: 637-644.
3. Letai, A, Coulombe, PA, McCormick, MB, Yu, QC, Hutton, E, and Fuchs, E (1993). Disease severity correlates with position of keratin point mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 3197-3201.
4. Sorensen, CB, Ladekjaer-Mikkelsen, AS, Andresen, BS, Brandrup, F, Veien, NK, Buus, SK, *et al.* (1999). Identification of novel and known mutations in the genes for keratin 5 and 14 in Danish patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. *The Journal of investigative dermatology*, vol. 112: United States. pp 184-190.
5. Chamcheu, JC, Siddiqui, IA, Syed, DN, Adhami, VM, Liovic, M, and Mukhtar, H (2011). Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys*, vol. 508: United States. pp 123-137.
6. Coulombe, PA, Kerns, ML, and Fuchs, E (2009). Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *The Journal of clinical investigation* **119**: 1784-1793.
7. Uitto, J, Bruckner-Tuderman, L, McGrath, JA, Riedl, R, and Robinson, C (2018). EB2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. *The Journal of investigative dermatology* **138**: 1010-1016.
8. Wally, V, Lettner, T, Peking, P, Peckl-Schmid, D, Murauer, EM, Hainzl, S, *et al.* (2013). The pathogenetic role of IL-1beta in severe epidermolysis bullosa simplex. *The Journal of investigative dermatology*, vol. 133: United States. pp 1901-1903.
9. Wally, V, Hovnanian, A, Ly, J, Buckova, H, Brunner, V, Lettner, T, *et al.* (2018). Diacerein orphan drug development for epidermolysis bullosa simplex: A phase 2/3 randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology* **78**: 892-901 e897.
10. Chamcheu, JC, Lorie, EP, Akgul, B, Bannbers, E, Virtanen, M, Gammon, L, *et al.* (2009). Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. *Journal of dermatological science*, vol. 53: Netherlands. pp 198-206.
11. Bchetnia, M, Lacroix, J, Farez, T, Larouche, M, Powell, J, McCuaig, C, *et al.* (2016). Reduction in keratin aggregates in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes after pretreatment with trimethylamine N-oxide. *Experimental dermatology* **25**: 229-230.
12. Aushev, M, Koller, U, Mussolino, C, Cathomen, T, and Reichelt, J (2017). Traceless Targeting and Isolation of Gene-Edited Immortalized Keratinocytes from Epidermolysis Bullosa Simplex Patients. *Mol Ther Methods Clin Dev*, vol. 6: United States. pp 112-123.
13. Peking, P, Breitenbach, JS, Ablinger, M, Muss, WH, Poetschke, FJ, Kocher, T, *et al.* (2018). An ex-vivo RNA trans-splicing strategy to correct human generalized severe epidermolysis bullosa simplex. *The British journal of dermatology*.
14. Doudna, JA, and Charpentier, E (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096.
15. Cong, L, Ran, FA, Cox, D, Lin, S, Barretto, R, Habib, N, *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819-823.
16. Jinek, M, Chylinski, K, Fonfara, I, Hauer, M, Doudna, JA, and Charpentier, E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, vol. 337: United States. pp 816-821.

17. Ran, FA, Hsu, PD, Wright, J, Agarwala, V, Scott, DA, and Zhang, F (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**: 2281-2308.
18. Mali, P, Yang, L, Esvelt, KM, Aach, J, Guell, M, DiCarlo, JE, *et al.* (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, vol. 339: United States. pp 823-826.
19. March, OP, Reichelt, J, and Koller, U (2018). Gene editing for skin diseases: designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders. *Experimental physiology* **103**: 449-455.
20. Kocher, T, Peking, P, Klausegger, A, Murauer, EM, Hofbauer, JP, Wally, V, *et al.* (2017). Cut and Paste: Efficient Homology-Directed Repair of a Dominant Negative KRT14 Mutation via CRISPR/Cas9 Nickases. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **25**: 2585-2598.
21. Firth, AL, Menon, T, Parker, GS, Qualls, SJ, Lewis, BM, Ke, E, *et al.* (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports* **12**: 1385-1390.
22. Xie, F, Ye, L, Chang, JC, Beyer, AI, Wang, J, Muench, MO, *et al.* (2014). Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*, vol. 24: United States. pp 1526-1533.
23. Prakash, V, Moore, M, and Yanez-Munoz, RJ (2016). Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 24: United States. pp 465-474.
24. Song, B, Fan, Y, He, W, Zhu, D, Niu, X, Wang, D, *et al.* (2015). Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem cells and development* **24**: 1053-1065.
25. Long, C, McAnally, JR, Shelton, JM, Mireault, AA, Bassel-Duby, R, and Olson, EN (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* **345**: 1184-1188.
26. Flynn, R, Grundmann, A, Renz, P, Hanseler, W, James, WS, Cowley, SA, *et al.* (2015). CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Experimental hematology* **43**: 838-848 e833.
27. Chang, CW, Lai, YS, Westin, E, Khodadadi-Jamayran, A, Pawlik, KM, Lamb, LS, Jr., *et al.* (2015). Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell reports* **12**: 1668-1677.
28. Yin, H, Xue, W, Chen, S, Bogorad, RL, Benedetti, E, Grompe, M, *et al.* (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, vol. 32: United States. pp 551-553.
29. Yang, Y, Wang, L, Bell, P, McMenamin, D, He, Z, White, J, *et al.* (2016). A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*, vol. 34: United States. pp 334-338.
30. Bassuk, AG, Zheng, A, Li, Y, Tsang, SH, and Mahajan, VB (2016). Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep*, vol. 6: England. p 19969.
31. Men, K, Duan, X, He, Z, Yang, Y, Yao, S, and Wei, Y (2017). CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. *Sci China Life Sci*, vol. 60: China. pp 447-457.
32. Hustedt, N, and Durocher, D (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol*, vol. 19: England. pp 1-9.
33. Otto, T, and Sicinski, P (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, vol. 17: England. pp 93-115.
34. Zetsche, B, Gootenberg, JS, Abudayyeh, OO, Slaymaker, IM, Makarova, KS, Essletzbichler, P, *et al.* (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**: 759-771.
35. Maruyama, T, Dougan, SK, Truttmann, MC, Bilate, AM, Ingram, JR, and Ploegh, HL (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, vol. 33: United States. pp 538-542.

36. Song, J, Yang, D, Xu, J, Zhu, T, Chen, YE, and Zhang, J (2016). RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun*, vol. 7: England. p 10548.
37. Haapaniemi, E, Botla, S, Persson, J, Schmierer, B, and Taipale, J (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, vol. 24: United States. pp 927-930.
38. Kleinstiver, BP, Pattanayak, V, Prew, MS, Tsai, SQ, Nguyen, NT, Zheng, Z, *et al.* (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, vol. 529: England. pp 490-495.
39. Fu, Y, Foden, JA, Khayter, C, Maeder, ML, Reyon, D, Joung, JK, *et al.* (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, vol. 31: United States. pp 822-826.
40. Richardson, CD, Ray, GJ, DeWitt, MA, Curie, GL, and Corn, JE (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*, vol. 34: United States. pp 339-344.
41. Webber, BR, Osborn, MJ, McElroy, AN, Twaroski, K, Lonetree, CL, DeFeo, AP, *et al.* (2016). CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *NPJ Regenerative medicine* **1**.
42. Thorvaldsdottir, H, Robinson, JT, and Mesirov, JP (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, vol. 14: England. pp 178-192.

## CHAPITRE II : DISCUSSION GÉNÉRALE

L'épidermolyse bulleuse simplex est une maladie dermatologique rare causée par une mutation dans un des gènes impliqués dans la formation du cytosquelette de kératine. Les différentes couches de la peau ne peuvent donc pas se lier entre elles. Aucun traitement n'est disponible actuellement pour soulager définitivement les patients atteints de la maladie. Les seules approches thérapeutiques disponibles contribuent à améliorer leur qualité de vie, sans pour autant les guérir. L'avenir pour le traitement de ce type de maladie semble résider dans l'utilisation de technologies d'édition du génome permettant de corriger les mutations causales directement dans l'ADN du patient. Dans ce projet, il était question d'optimiser l'utilisation de la méthode CRISPR/Cas9 dans des cellules HEK293T dans le contexte de l'EBS, pour démontrer que cette approche est possible. Les premiers essais sur les fibroblastes primaires des patients ont aussi été réalisés dans ce projet.

Les résultats étant présentés dans l'article scientifique de ce mémoire, les prochaines lignes feront plutôt état d'une discussion générale en lien avec le projet de recherche présenté. La discussion sera divisée en trois sections. En premier lieu, des éléments du projet tels que la sélection de la méthode d'édition du génome, la présence de recombinaison non-homologue, la recombinaison homologue en présence d'un ADN donneur et l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 dans les fibroblastes primaires seront tous abordés. En deuxième lieu, la contribution du présent projet de recherche au développement d'une thérapie génique pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse simplex sera présentée dans les perspectives. Pour terminer, les considérations éthiques entourant l'édition du génome et l'avis de quelques membres de la communauté scientifique seront discutés.

### 1. Retour sur les objectifs

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'optimiser un protocole d'édition du génome dans les cellules commerciales dans le but de trouver une thérapie pour soulager les patients atteints de l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS). Pour chacun des résultats présentés précédemment, les choix des diverses techniques seront expliqués en fonction de

la littérature consultée et les limites liées à la méthode, de même que les difficultés rencontrées seront discutées en cours de route.

### 1.1. Choix de la méthode d'édition du génome

La première étape permettant d'atteindre cet objectif est la sélection de la technologie d'édition du génome à utiliser. À la lumière de ce qui a été présenté dans les pages précédentes, la technologie CRISPR/Cas9 a été sélectionnée dans le cadre de ce projet. Initialement présentée par Ran *et al.*, la technique permet de modifier facilement et précisément une région de l'ADN.<sup>140</sup> Plusieurs études ont démontré que cette technologie peut être utilisée dans le cas de maladies rares comme les épidermolyses bulleuses. En 2017, les équipes de Hainzl *et al.*<sup>206</sup> et Kocher *et al.*<sup>79</sup> ont travaillé à l'édition génétique de mutations causant respectivement l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR) et l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS). L'équipe de Hainzl *et al.* est parvenue à corriger une mutation dans le gène *COL7A1* causant l'EBDR en utilisant une approche standard, c'est-à-dire à l'aide d'une protéine Cas9, un ARN guide (ARNgs) et un ADN double brin contenu dans un vecteur. Après analyse, ils ont évalué le taux de correction à 30%.<sup>206</sup> Kocher *et al.* ont quant à eux utilisé la technologie en couplant deux Cas9 de sorte à couper un morceau d'ADN en entier, dans l'optique d'augmenter l'efficacité de la recombinaison. Leur pourcentage d'efficacité oscille également autour de 30%.<sup>79</sup> Ensuite, en 2018, Bennati *et al.* ont réalisé la première étude portant sur l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 sur des kératinocytes de patient possédant une mutation dans le gène *LAMB3* causant l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ).<sup>207</sup> Ils ont utilisé la SpCas9 combinée à un ARNgs et un ADN donneur constitué d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) permettant de réparer la mutation. Une des particularités de l'ADN donneur est d'être composé d'une séquence de plusieurs exons du gène, soit les exons 3 à 23, rendant son utilisation plus versatile. Après avoir transplanté les cellules humaines corrigées génétiquement à des souris immunosupprimées, l'équipe de chercheurs a observé l'effet de la correction sur la structure de la peau. Ainsi, ils ont pu confirmer que la fonction de sous-unité bêta-3 de la laminine a été restaurée en observant l'histologie de biopsies de peau réalisées sur les souris.<sup>207</sup>

CRISPR/Cas9 est une technologie permettant de cibler différents endroits dans le génome lorsque la séquence du PAM (5'-NGG pour le type *S. pyogenes*) est présente à proximité de la mutation cible. Pour ce projet, la présence du PAM a été vérifiée dans les séquences nucléotidiques pour les six individus atteints d'EBS présent dans la biobanque. Seuls deux d'entre eux présentaient le PAM près de la mutation et pouvaient faire partie de l'étude. Bien que cette technologie soit versatile, elle demeure limitée quant aux cibles dans l'ADN. Pour diversifier ces cibles, d'autres variants de la Cas9 développées dans les dernières années, comme les cytidines désaminases et les adénosines désaminases, pourraient être utilisés.

Le choix de la technologie d'édition du génome s'est donc arrêté sur la technologie CRISPR/Cas9 standard puisque cette technologie avait déjà fait ses preuves et que la présence du PAM adéquat chez deux des patients offrait la possibilité d'utiliser la Cas9 provenant de *S. pyogenes*.

## **1.2. Présence de recombinaison non-homologue**

La seconde étape du projet consiste à utiliser la méthode CRISPR/Cas9 dans les cellules commerciales, soit les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293T), pour vérifier la fonctionnalité de la technique. Les cellules HEK293T ont été privilégiées pour l'optimisation de la méthode puisqu'elles sont reconnues comme étant des cellules faciles à transfecter et qui ont un taux de croissance élevé. En 2017, Hainzl *et al.* ont utilisé les cellules HEK293T pour démontrer la présence de RNH.<sup>206</sup> Leurs résultats démontrent que plus de 90% des cellules ont été transfectées avec succès,<sup>206</sup> ce qui concorde avec les résultats obtenus dans le présent projet de recherche où plus de 70 % des cellules ont été transfectées puisqu'elle exprimaient le gène de la protéine fluorescente verte (GFP) présent dans le vecteur. Ensuite, dans des études précédentes, il a été démontré qu'en absence d'ADN donneur, la coupure double brin de l'ADN induite par la protéine Cas9 est réparée de façons aléatoires par la machinerie cellulaire, entraînant la recombinaison non-homologue (RNH).<sup>208</sup> La méthode utilisant une nucléase Surveyor capable de détecter les mésappariements dans la séquence de l'ADN génomique a été utilisée pour vérifier la présence de RNH, selon le protocole de Ran *et al.*.<sup>140</sup> Les premiers essais réalisés n'ont pas



été concluants. Pour résoudre ce problème, de nouvelles transfections ont été réalisées en augmentant la quantité de vecteurs utilisée afin d'optimiser la transfection. Également, quelques problèmes ont été rencontrés lors de la migration des produits de digestion avec la nucléase Surveyor, tels que la durée de la migration, le voltage, ainsi que la méthode utilisée pour révéler les bandes sur le gel de polyacrylamide. Les résultats ont démontré que tous les ARN guides simples brins ciblent la région de l'ADN désirée, et ce, pour chacune des mutations à l'étude. L'analyse des séquences nucléotidiques à l'aide du logiciel TIDE a été réalisée, permettant ainsi de confirmer la présence de RNH dans l'ADN des cellules HEK293T modifiées génétiquement à l'aide de CRISPR/Cas9. En 2019, Takashima et son équipe ont réalisé un projet portant sur l'utilisation de CRISPR/Cas9 dans l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive.<sup>209</sup> Ils ont validé la RNH dans les cellules HEK293T avant de procéder aux essais sur des fibroblastes humains. Leurs travaux utilisent un protocole similaire pour valider la RNH, soit le recours à la nucléase Surveyor et au logiciel TIDE. Ils ont détecté une variabilité dans leurs résultats où l'efficacité de CRISPR/Cas9 est variable, tel qu'observé dans le présent projet de recherche, lors de la vérification de la RNH dans les cellules HEK293T.<sup>209</sup>

### **1.3. Recombinaison homologue en présence d'un ADN donneur**

La troisième étape du projet consiste à utiliser la technologie CRISPR/Cas9 dans les cellules HEK293T en présence d'un ADN donneur pour induire la recombinaison homologue (RH). Pour réparer la coupure double brin (CDB) induit par la Cas9, deux types d'ADN donneurs ont été sélectionnés en se basant sur les travaux des équipes de Paquet *et al.* et Ran *et al.*<sup>140; 210</sup> La première équipe, celle de Paquet *et al.*, a travaillé à l'utilisation d'un ADN simple brin (ADNsb), en respectant certaines conditions, dont la présence d'un minimum de 40 pb de part et d'autre de la mutation et l'ajout d'un variant silencieux dans la séquence.<sup>210</sup> Ce variant ne doit pas provoquer de modifications dans la séquence des acides aminés composant les protéines, pour ne pas induire de nouvelles mutations. Pour les deux patients à l'étude, il a été possible de créer les séquences des ADNsb en respectant ces conditions. Ensuite, l'équipe de Bialk *et al.* a réalisé une étude utilisant également un ADNsb.<sup>211</sup> Pour détecter sa présence dans l'ADN génome des cellules, ils ont eu recours à un séquençage Sanger pour détecter le variant, mutation silencieuse, ajoutée dans la séquence de l'ADNsb.

Ainsi, la présence de recombinaison homologue a été validée avec succès par la présence de cet ADNsb.

La seconde équipe, celle de Ran *et al.*, a utilisé un ADN donneur double brin (ADNdb) pour réparer la CDB.<sup>140</sup> Les problèmes rencontrés dans cette partie du projet ne sont pas liés à la sélection de l'ADNdb, mais plutôt à la méthode à utiliser pour vérifier l'insertion de cet ADN donneur dans l'ADN génomique des cellules HEK293T. Pour vérifier la présence de RH, la technique présentée par Firth *et al.* a été utilisée. Son équipe et lui ont réalisé un projet utilisant CRISPR/Cas9 dans le contexte de la fibrose kystique.<sup>187</sup> Pour réparer la coupure laissée par l'activité de la Cas9, un ADNdb contenant une portion du vecteur véhiculant cet ADN donneur a été utilisé.<sup>187</sup> Ainsi, des amorces de PCR où l'une se trouve dans l'ADN génomique, et l'autre dans la cassette du vecteur, ont été créés pour cibler l'ADN donneur. De cette façon, lorsque la PCR produit un résultat (c'est-à-dire une bande d'ADN), cela indique qu'il y a présence de RH dans les cellules. Les résultats obtenus concordent avec ceux de l'article de Firth *et al.*<sup>187</sup> puisque toutes les bandes obtenues lors de la PCR confirment l'insertion de l'ADN donneur dans l'ADN génomique. Un séquençage Sanger a permis de confirmer que la totalité de l'ADNdb était intégré au génome de la cellule. Bien que cette technique ait bien fonctionné, des difficultés ont été rencontrées au moment de l'optimisation de chacun des couples d'amorces puisque l'ADN utilisé pour l'optimisation de la PCR devait provenir des cellules transfectées. Pour corriger le problème, la quantité d'ADN à amplifier a été augmentée afin d'aller chercher davantage l'ADN des cellules transfectées avec succès. Pour améliorer davantage la méthode, l'utilisation d'un appareil comme un cytomètre de flux avec trieur de cellules, permettant de sélectionner seulement les cellules transfectées, rendrait la tâche moins ardue. Cela serait rendu possible par la production d'une protéine fluorescente verte (GFP) présente dans le vecteur contenant l'ADN donneur. Malgré cette difficulté, il a été démontré que la RH se produit dans les cellules transfectées avec les composantes de CRISPR/Cas9 et l'ADN donneur double brin.

#### **1.4. Utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 dans les fibroblastes primaires**

La dernière partie de ce projet de maîtrise a pour objectif de réaliser les premiers essais de la technologie CRISPR/Cas9 dans les fibroblastes primaires de patients atteints de l'épidermolyse bulleuse simple (EBS). Les mêmes composantes de CRISPR/Cas9 ont été utilisées pour transfecter les fibroblastes primaires pour vérifier, en premier lieu, la présence de recombinaison non-homologue (RNH). La technique utilisée pour la transfection est l'électroporation, une technique privilégiée pour l'insertion de matériel génétique dans des cellules primaires comme les fibroblastes primaires.<sup>212</sup> Lors des premières transfections de fibroblastes primaires, il était impossible de détecter la présence de RNH, puisque les cellules primaires peuvent avoir un taux de transfection plus faible que les cellules commerciales.<sup>206</sup> Une forte mortalité était également observée chez les cellules transfectées par électroporation. Dans le but d'augmenter ce pourcentage de RNH, certaines hypothèses ont été étudiées. La première hypothèse suppose que les paramètres utilisés pour l'électroporation des fibroblastes primaires n'étaient pas optimaux. De nouveaux essais ont permis d'ajuster le voltage et la durée du courant électrique dans les cellules. Une autre hypothèse suppose qu'il pouvait y avoir peu d'ADN de vecteur utilisé pour la transfection. Des ajustements dans les quantités d'ADN utilisés ont alors été réalisés. Une dernière hypothèse est la sélection à la puromycine utilisée pour sélectionner seulement les cellules dont les vecteurs sont entrés à l'intérieur des cellules. Le vecteur transfecté contient un gène de résistance à la puromycine expliquant pourquoi la cellule développe une résistance à la suite de la transfection. Trop de puromycine pendant une longue durée pourrait affecter grandement les cellules et augmenter la mortalité. Une telle sélection s'avère toutefois nécessaire pour sélectionner les cellules modifiées génétiquement par CRISPR/Cas9.<sup>206</sup> À la suite de ces ajustements, une analyse de la RNH a démontré que la RNH était variable, dépendamment de la mutation ciblée, et les données sont inférieures à celles obtenues avec les cellules HEK293T. Après optimisation du protocole, il a été déterminé que la RNH était également possible dans les fibroblastes primaires.

Ensuite, de nouvelles transfections ont été réalisées en ajoutant un ADN donneur pour vérifier que les fibroblastes primaires réalisent la réparation par recombinaison homologue (RH). Les problèmes rencontrés précédemment ont également fait en sorte que la présence ou non de RH a dû être vérifiée d'une manière différente pour ce type cellulaire. Initialement, dans les cellules HEK293T, une PCR permet de détecter la RH lors de l'utilisation d'un ADN donneur double brin (ADNdb), alors que le séquençage permet de repérer la présence du variant dans l'ADN donneur simple brin (ADNsb). L'utilisation de ces deux méthodes n'a pas bien fonctionné, puisque le pourcentage de cellules transfectées efficacement était faible et que peu de cellules résistent à la sélection à la puromycine. Pour pallier à ce problème, une approche utilisant le séquençage à haut débit a été utilisée pour établir la proportion de cellules ayant intégré les ADN donneurs dans leurs génomes. Cependant, les analyses ont révélé que très peu de RH est présente dans les cellules, autant avec un ADNdb qu'un ADNsb. La littérature ne permet toutefois pas d'établir si ces résultats sont normaux puisque ce projet combine deux approches différentes.

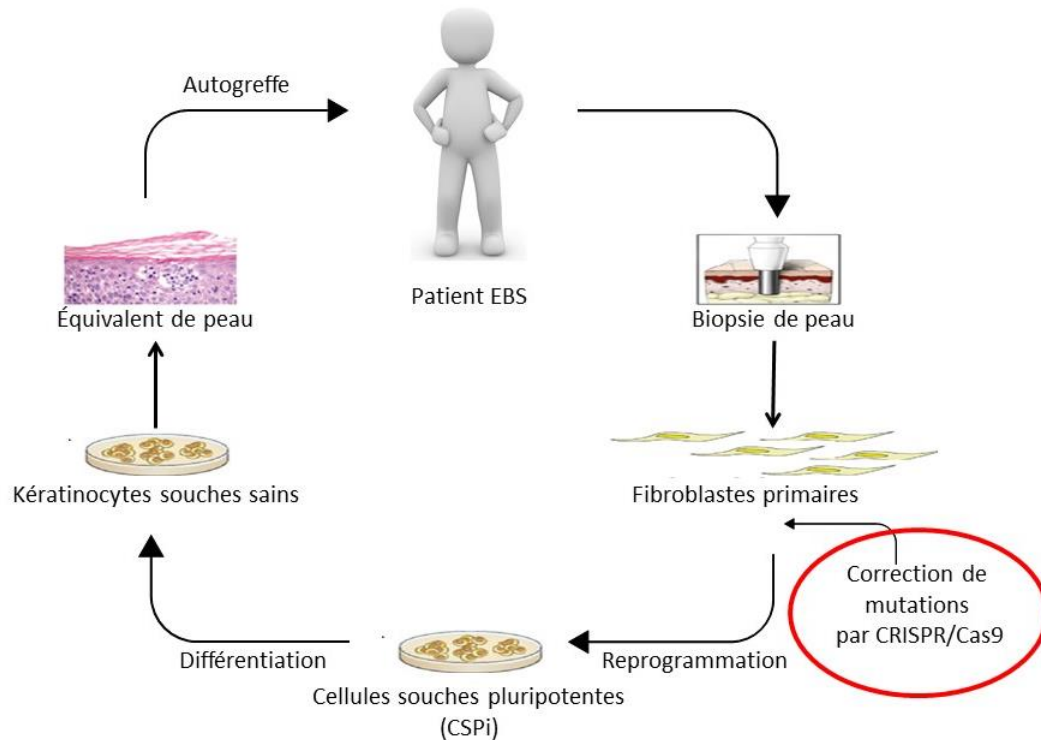
## **2. Perspectives**

Le présent projet de recherche a permis de documenter l'utilisation de la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 dans le contexte d'une maladie dermatologique, soit l'épidermolyse bulleuse simplex. Les résultats ont démontré que cette technologie s'avère une avenue prometteuse pour la correction génétique de mutations de patients atteints de la maladie. De plus, elle a été appliquée à deux patients portant des mutations situées sur des gènes différents, confirmant l'aspect versatile de la technique. Pour la suite du projet, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres technologies d'édition du génome dans l'optique d'améliorer notamment la proportion de recombinaison homologue à l'intérieur des cellules. Cela pourrait être rendu possible par l'emploi de variantes de protéine Cas9 plus efficace qui ont été développées avec les années. Également, le recours à d'autres versions de CRISPR/Cas9, comme les technologies d'édition des bases, permettrait de corriger certaines mutations pour lesquelles il est impossible d'utiliser la Cas9 conventionnelle. En effet, les adénosines désaminases et les cytidines désaminases semblent des avenues intéressantes pour modifier un seul nucléotide à la fois dans la séquence d'ADN.

Ensuite, comme il a été vu précédemment, de nombreuses équipes de recherche sur les maladies dermatologiques, comme les épidermolyses bulleuses, réalisent les modifications génétiques directement sur des kératinocytes issus de biopsies cutanées de leurs patients. Contrairement à eux, dans ce projet, l'utilisation des fibroblastes primaires a été privilégiée, notamment pour cause de disponibilité des cellules. Il serait possible de reprogrammer des fibroblastes primaires en cellules souches pluripotentes induites (CSPi) à l'aide de facteurs de reprogrammation et de les différencier par la suite en kératinocytes primaires avant de procéder à la modification génétique. Toutefois, il serait intéressant de réaliser un essai avec CRISPR/Cas9 pour déterminer si la proportion de cellules corrigées par la recombinaison homologue est plus grande.

Également, pour s'assurer que les fonctions des protéines corrigées ont été restaurées, des analyses supplémentaires devraient être réalisées. L'extraction des protéines et la réalisation d'un western blot permettraient d'observer si la protéine est de nouveau produite dans les cellules corrigées et d'en évaluer potentiellement la quantité. Pour aller plus loin, il serait également intéressant de procéder à des essais sur modèles murins avant de faire les premiers essais de greffes de peau sur les individus malades pour observer l'impact que les cellules corrigées pourraient avoir sur un organisme vivant. Cela permettrait complémentaiement de réaliser une étude plus poussée au niveau histologique, permettant ainsi de voir si la structure de la peau est restaurée.<sup>207</sup> Des analyses par immunofluorescence<sup>79</sup> pourraient en outre être réalisées pour vérifier l'absence d'agrégats de kératines pour les cas d'EBS plus sévères.<sup>213</sup>

L'optimisation de la méthode dans les cellules HEK293T a permis la réalisation des premiers essais de la technologie CRISPR/Cas9 sur des fibroblastes primaires. Bien que les résultats soient porteurs d'espoir pour la suite du projet, beaucoup de travail est encore à réaliser avec les collaborateurs de ce projet.



**Figure 28. Contribution du projet de recherche pour la correction de mutations causant l'épidermolyse bulleuse simplex par CRISPR/Cas9**

Le présent projet de recherche a permis d'optimiser la méthode pour l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 (étape en rouge) pour corriger des mutations responsables de l'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) chez deux patients. La suite du projet implique la reprogrammation des fibroblastes corrigés en cellules souches pluripotentes induites (CSPi) pour les différencier en kératinocytes sains qui pourront être utilisés pour la synthèse d'équivalents de peau permettant de réaliser des autogreffes chez les individus atteints de la maladie.

La suite du projet, sur une vision à long terme, comprend la synthèse d'un équivalent de peau à partir de kératinocytes sains obtenus par la reprogrammation des fibroblastes corrigés en cellules souches pluripotentes induites. Cela permettra de faire des autogreffes chez le patient, de sorte à diminuer les risques de rejet de la greffe. Ce projet est réalisé en collaboration, entre autres, avec le centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval (LOEX), plus précisément Lucie Germain, ainsi que Jacques P. Tremblay.

### 3. Considérations éthiques

Les technologies d'édition du génome sont de plus en plus utilisées depuis les dernières années. Toutefois, peu de ses utilisateurs ont conscience des répercussions que peut avoir leur utilisation. Avec l'apparition de nouvelles technologies, comme CRISPR/Cas9 et ses dérivés, les projets d'édition génomique se sont multipliés à grande vitesse, si vite que

les répercussions n'ont pas été totalement mesurées à ce jour. L'application de ces méthodes est de plus en plus discutée au niveau éthique puisque ces technologies peuvent avoir beaucoup d'impact. La population scientifique doit s'interroger davantage sur les motivations qui les entraînent à utiliser ces technologies et sur les conséquences qu'elles peuvent avoir sur les individus et sur la société de même que sur les balises encadrant sa pratique.

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire implique la modification génétique de cellules atteintes ou non de l'épidermolyse bulleuse simplex. En tant que chercheurs, il est de notre devoir de se questionner à savoir si ce projet est éthiquement acceptable.

### **3.1. Bienfaits et risques de l'édition du génome**

Pour connaître tous les aspects éthiques pouvant être liés aux technologies de modification de l'ADN, il est nécessaire de connaître les applications générales de la technologie. Elles peuvent être utilisées dans les laboratoires de recherches standards et permettre l'édition du génome dans les cellules et les tissus à des fins de recherche et contribuer à l'avancement des connaissances dans le domaine.<sup>214</sup> Les technologies d'édition du génome peuvent être utilisées sur deux types de cellules, soit les cellules somatiques et les cellules germinales.<sup>214</sup> Les cellules somatiques se trouvent à être des cellules qui se divisent, mais n'étant pas transmises aux descendants, comme les cellules constituant la peau. L'utilisation de ces technologies contribue à la découverte de nouveaux traitements pour des maladies, en servant notamment de thérapie génique. Les cellules germinales constituent les cellules permettant de se reproduire. Ces technologies permettraient, dans ce cas, d'approfondir les connaissances sur le développement des humains et de la fertilité.<sup>214</sup> L'édition de cellules somatiques pour prévenir et traiter des maladies génétiques se limite quant à elle aux individus. La correction des mutations dans ces cellules ne se transmet pas de génération en génération. Cela est rendu possible seulement si l'édition du génome survient dans les cellules germinales impliquées dans la reproduction.<sup>214</sup>

Pour la majorité des gens, ces technologies qui corrigent des mutations à même le génome sont difficiles à concevoir. Lors de la réalisation de leurs travaux de recherche, les chercheurs sont pleinement au courant des aspects négatifs de l'application de technologies comme CRISPR/Cas9. Ainsi, plusieurs grands risques y sont liés, tels que la possibilité d'avoir des modifications « hors cibles » (de l'anglais *off-target*) lors de la recombinaison non-homologue (RNH), la possibilité que le gène principal soit muté et l'inconnu face aux conséquences que l'édition du génome peut avoir à long terme chez les individus.<sup>215; 216</sup> Également, comparativement aux autres technologies disponibles, CRISPR/Cas9 est celle la plus susceptible de créer des « hors-cibles ».<sup>217</sup> Cependant, plusieurs éléments positifs sont liés à leur utilisation. Lorsque la mutation causant la maladie se trouve dans les cellules somatiques présentes dans des tissus, la mutation ne sera pas transmise à la descendance. La modification génétique sera réalisée uniquement sur l'individu malade et seul ce dernier bénéficiera des bienfaits.<sup>215</sup>

### 3.2. Législation en vigueur

L'édition du génome est une technique utilisée actuellement dans plusieurs laboratoires à travers le monde. Au Canada, la loi qui régit l'utilisation de technologies comme CRISPR/Cas9 est la loi sur la procréation assistée.<sup>218; 219</sup> Leur utilisation constitue une violation cette loi lorsqu'utilisée sur des cellules germinales, car la section 5 stipule qu'il est interdit de « modifier le génome d'une cellule d'un être humain ou d'un embryon *in vitro* de manière à rendre la modification transmissible aux descendants » et « dans l'intention de créer un être humain, accomplir un acte ou fournir, prescrire ou administrer quelque chose pour obtenir — ou augmenter les chances d'obtenir — un embryon d'un sexe déterminé ou pour identifier le sexe d'un embryon *in vitro*, sauf pour prévenir, diagnostiquer ou traiter des maladies ou des anomalies liées au sexe ».<sup>220</sup> En d'autres termes, la modification du génome est permise dans la mesure où les modifications ne seront pas transmises aux descendants. Aux États-Unis, la *Food and Drug Administration* (FDA) régle l'utilisation des technologies selon la nature de la modification, la sécurité, les risques ainsi que les bénéfices liés la méthode.<sup>221</sup> Dans l'ouvrage de la *National Academies of Science Engineering Medicine*,<sup>214</sup> plusieurs recommandations sont réalisées à ce sujet : promotion du bien-être, transparence, science responsable, respect des personnes, justice et la coopération



translationnelle. Également, la FDA interdit à quiconque de faire de la recherche sur des embryons humains dans le but avoué de créer ou modifier le génome pour induire une modification génétique héréditaire.<sup>214</sup> La loi américaine indique cependant qu'il serait possible de permettre l'édition du génome si cela respecte le cadre des règlements établis, comme l'absence de traitements, la prévention de la maladie ou encore la surveillance des patients pour s'assurer de la sécurité et la santé de ce dernier.<sup>214</sup> Le Royaume-Unis est devenu, en 2015, le premier pays à légaliser la modification du génome en acceptant le remplacement des mitochondries dans l'ovule d'une mère malade par celles d'une donneuse.<sup>222</sup>

### 3.3. Opinions dans le monde scientifique

Les principales préoccupations du monde scientifique se posent davantage au niveau de l'édition génétique des cellules germinales. Il n'y a aucune façon réelle de contrer ce phénomène étant donné le manque de législations strictes à ce sujet.<sup>215</sup> Les chercheurs indiquent que, bien qu'il soit important de soulever les aspects éthiques en lien avec l'édition des cellules germinales, il n'existe aucune manière de prévoir les effets de ces modifications sur les patients sur une longue période de temps.<sup>216</sup> Les chercheurs sont d'avis que l'utilisation d'une telle technique serait éthiquement acceptable si la technique est sécuritaire pour l'enfant à naître.<sup>215</sup> Certains chercheurs sont également d'avis qu'il faudrait vérifier l'impact des modifications génétiques sur des cellules somatiques, avant de penser à l'utiliser sur des embryons.<sup>215</sup>

Certaines revues ont également pris position sur la nouvelle réalité que constitue l'édition du génome. C'est le cas, entre autres de l'*American Society of Human Genetics* qui a publié, en collaboration avec l'*European Society of Human Genetics* en août 2017, un article au sujet de leur prise de position par rapport à cette nouvelle réalité. Plusieurs positions sont énumérées par les auteurs, en voici quelques-unes : aucune grossesse ne doit être issue de cellules germinales modifiées, la réalisation d'expérimentations sur des embryons et des gamètes est acceptée si l'accord des donneurs est obtenu et l'utilisation de technologies d'édition est acceptable en essai clinique si les raisons sont rationnelles et si le processus est transparent au public.<sup>223</sup> Le Conseil Consultatif National d'éthique, un regroupement

d'éthiciens indépendants, a réalisé une revue de littérature sur l'édition du génome en 2016. Ce conseil indique notamment que l'édition génomique peut être utilisée afin d'améliorer l'état de santé de l'individu malade.<sup>224</sup> Également, cela permettrait d'approfondir certains sujets d'étude, comme le développement d'un traitement potentiel pour une pathologie, mais aussi l'amélioration des techniques d'édition du génome.<sup>224</sup> De même, ils indiquent que l'utilisation de ces technologies devrait être suivie de très près puisque la sûreté et l'efficacité de ces techniques n'ont toujours pas été démontrées.<sup>224</sup>

La communauté scientifique semble donc être divisée à propos des technologies d'édition de l'ADN. Dans le cas du projet présenté dans ce mémoire, les cellules utilisées sont des cellules somatiques qui ne seront pas transmises aux descendants du patient. Également, la technologie CRISPR/Cas9 est utilisée dans l'objectif avoué de trouver un traitement pour l'épidermolyse bulleuse simplex pour soulager définitivement les personnes atteintes de la maladie, ce qui respecte la législation en vigueur au Canada.

## CONCLUSION

L'épidermolyse bulleuse simplex demeure une maladie orpheline pour laquelle il n'existe pas de traitements pour soulager définitivement les patients. Avec les années, les technologies d'édition du génome se sont beaucoup développées, de sorte à éveiller l'espoir non seulement des chercheurs, mais également des patients, qui espèrent trouver une cure à leur maladie.

Le présent projet avait pour objectif d'optimiser la technologie CRISPR/Cas9 pour induire une modification génétique par recombinaison homologue en utilisant des fragments d'ADN donneurs double et simple brin. Plus spécifiquement, le projet a permis de démontrer que la protéine Cas9, guidée par un ARN guide simple brin, est en mesure de cibler l'endroit désiré dans le génome des cellules HEK293T, sans induire de « hors-cibles ». Également, il a été démontré que la recombinaison homologue est possible, autant lors de l'utilisation d'un ADN double brin contenu dans un vecteur, que lors de l'utilisation de l'ADN simple brin. Effectivement, l'analyse des résultats par PCR et du séquençage Sanger ont permis de confirmer l'insertion des ADN donneurs dans l'ADN génomique des cellules transfectées. Finalement, la méthode a été utilisée dans les fibroblastes primaires, mais son efficacité est de beaucoup inférieure à celle observée dans les cellules HEK293T.

La suite de ce projet inclut l'amélioration des résultats de CRISPR/Cas9 dans les fibroblastes primaires afin d'obtenir une plus grande quantité de cellules corrigées à l'aide de cette technologie. Par la suite, les fibroblastes primaires corrigés pourront être reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites, permettant alors la création de kératinocytes sains pouvant être utilisés pour la synthèse de peau en trois dimensions pouvant éventuellement être greffée au patient pour le soulager définitivement des symptômes de l'EBS.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ovallee, W.K., and Nahirney, P.C. (2008). *Netter's Essential Histology*.(Philadelphie: Saunders/Elsevier).
2. Young, B., O'Dowd, G., and Woodford, P. (2015). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*.(Philadelphia: De Boeck Supérieur).
3. Stevens, A., and Lowe, J. (2005). *Human Histology*.(Philadelphie, Toronto: Elsevier Mosby).
4. Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17, 1063-1072.
5. Lullmann-Rauch, R. (2008). *Histologie*.(Bruxelles De Boeck).
6. Wheater, P.R., Young, B., and Heath, J.W. (2001). *Histologie fonctionnelle*.(Paris, Bruxelles: De Boeck).
7. Klosterman, L. (2008). *Skin*.(New York: Marshall Cavendish).
8. Wickett, R.R., and Visscher, M.O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control* 34, S98-S110.
9. Stevens, A., and Lowe, J. (2009). *Histologie humaine*.(Elsevier).
10. Prost-Squarcioni, C. (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux. *Medécine Science* 22, 131-137.
11. Marieb, E.N., and Hoehn, K. (2015). *Anatomie et physiologies humaines*.(Montréal: ERPI Sciences).
12. Arin, M.J. (2009). The molecular basis of human keratin disorders. *Human Genetic* 125, 355-373.
13. Moll, R., Divo, M., and Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129, 705-733.
14. Haines, R.L., and Lane, E.B. (2012). Keratins and disease at a glance. *Journal of Cell Sciences* 125, 3923-3928.
15. Gu, L.H., and Coulombe, P.A. (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current opinion in cell biology* 19, 13-23.
16. Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A., et al. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology* 174, 169-174.
17. Toivola, D.M., Boor, P., Alam, C., and Strnad, P. (2015). Keratins in health and disease. *Current opinion in cell biology* 32, 73-81.
18. Smith, F.J.D. (2003). The molecular genetics of keratin disorders. *American Journal of Dermatology* 4, 347-364.
19. Sorensen, C.B., Andresen, B.S., Brandrup, F., Veien, N.K., Buus, S.K., Anton-lamprecht, I., Kruse, T., Jensen, P.K., Eiberg, H., Bolund, L., et al. (1999). Identification of Novel and Known Mutations in the Genes for Keratin 5 and 14 in Danish Patients with Epidermolysis Bullosa Simplex: Correlation Between Genotype and Phenotype. *The Society for investigative Dermatology* 112, 184-190.
20. Uitto, J., Richard, G., and McGrath, J.A. (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental cell research* 313, 1995-2009.

21. Ishida-Yamamoto, A., Tanaka, H., Nakane, H., Takahashi, H., and Iizuka, H. (1998). Inherited Disorders of Epidermal Keratinisation. *Journal of dermatological science* 18, 139-154.
22. Rugg, E.L., and Leigh, I.M. (2004). The keratins and their disorders. *American Journal of Medical Genetic* 131C, 4-11.
23. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., and Meyers, M.A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science* 76, 229-318.
24. Irwin McLean, W.H., and Birgitte Lane, E. (1995). Intermediate filaments in disease. *Current opinion in cell biology* 7, 118-125.
25. Smith, F.J.D. (2003). The Molecular Genetics of Keratin Disorders. *American Journal of Clinal Dermatology* 4, 347-364.
26. Knobel, M., O'Toole, E.A., and Smith, F.J. (2015). Keratins and skin disease. *Cell Tissue Research* 360, 583-589.
27. Eskin-Schwartz, M., Drozhdina, M., Sarig, O., Gat, A., Jackman, T., Isakov, O., Shomron, N., Samuelov, L., Malchin, N., Peled, A., et al. (2017). Epidermolytic Ichthyosis Sine Epidermolysis. *American Journal of Dermatopathology* 39, 440-444.
28. Fine, J.D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R.A., Bauer, E.A., Bauer, J.W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M.F., et al. (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of American Academy of Dermatology* 70, 1103-1126.
29. Lucky, A.W., Dagaonkar, N., Lammers, K., Husami, A., Kissell, D., and Zhang, K. (2018). A comprehensive next-generation sequencing assay for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Pediatric dermatology*, 1-10.
30. March, O.P., Reichelt, J., and Koller, U. (2017). Gene editing for skin diseases: designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders. *Experimental Physiology*.
31. Schwieger-Briel, A., Weibel, L., Chmel, N., Leppert, J., Kernland-Lang, K., Gruninger, G., and Has, C. (2015). A COL7A1 variant leading to in-frame skipping of exon 15 attenuates disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *British Journal of Dermatology* 173, 1308-1311.
32. Gonzalez, M.E. (2013). Evaluation and treatment of the newborn with epidermolysis bullosa. *Seminars in perinatology* 37, 32-39.
33. Shinkuma, S. (2015). Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* 8, 275-284.
34. Fine, J.D. (2010). Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. *Annals of New York Academy of Science* 1194, 213-222.
35. Denyer, J., Pilay, E., and Clapham, J. (2017). Best Practice Guidelines: Skin and Wound Care in Epidermolysis bullosa. In, *Wounds International*, ed. (London).
36. Osborn, M.J., Starker, C.G., McElroy, A.N., Webber, B.R., Riddle, M.J., Xia, L., DeFeo, A.P., Gabriel, R., Schmidt, M., von Kalle, C., et al. (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Molecular Therapy* 21, 1151-1159.
37. Webber, B.R., Osborn, M.J., McElroy, A.N., Twaroski, K., Lonetree, C.-l., DeFeo, A.P., Xia, L., Eide, C., Lees, C.J., McElmurry, R.T., et al. (2016). CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *npj Regenerative Medicine* 1, 1-11.

38. Mellerio, J.E., Robertson, S.J., Bernardis, C., Diem, A., Fine, J.D., George, R., Goldberg, D., Halmos, G.B., Harries, M., Jonkman, M.F., et al. (2016). Management of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with epidermolysis bullosa: best clinical practice guidelines. *British Journal of Dermatology* 174, 56-67.
39. Goldschneider, K., Good, J., Harrop, E., Liossi, C., Lynch-Jordan, A., Martinez, A.E., Maxwell, L.G., and Stanko-Loop, D. (2014). Pain care for patients with epidermolysis bullosa: best care practice guidelines. *BMC medicine* 12, 178-201.
40. Kramer, S.M., Serrano, M.C., Zillmann, G., Galvez, P., Araya, I., Yanine, N., Carrasco-Labra, A., Oliva, P., Brignardello-Petersen, R., Villanueva, J., et al. (2012). Oral health care for patients with epidermolysis bullosa--best clinical practice guidelines. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 1-35.
41. Tolar, J., Xia, L., Riddle, M.J., Lees, C.J., Eide, C.R., McElmurry, R.T., Titeux, M., Osborn, M.J., Lund, T.C., Hovnanian, A., et al. (2011). Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 848-856.
42. Kiritsi, D., Garcia, M., Brander, R., Has, C., Meijer, R., Jose Escamez, M., Kohlhase, J., van den Akker, P.C., Scheffer, H., Jonkman, M.F., et al. (2014). Mechanisms of natural gene therapy in dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 2097-2104.
43. Kiritsi, D., Has, C., and Bruckner-Tuderman, L. (2013). Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell adhesion & migration* 7, 135-141.
44. Kroeger, J.K., Hofmann, S.C., Leppert, J., Has, C., and Franzke, C.W. (2017). Amino acid duplication in the coiled-coil structure of collagen XVII alters its maturation and trimerization causing mild junctional epidermolysis bullosa. *Human molecular genetics* 26, 479-488.
45. Has, C., and Bruckner-Tuderman, L. (2014). The genetics of skin fragility. *Annual Review of Genomics Human Genetics* 15, 245-268.
46. Bruckner-Tuderman, L., and Has, C. (2014). Disorders of the cutaneous basement membrane zone--the paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology* 33, 29-34.
47. Brun, J., Chiaverini, C., Devos, C., Leclerc-Mercier, S., Mazereeuw, J., Bourrat, E., Maruani, A., Mallet, S., Abasq, C., Phan, A., et al. (2017). Pain and quality of life evaluation in patients with localized epidermolysis bullosa simplex. *Orphanet Journal of Rare Disease* 12, 119-127.
48. Boeira, V.L.S.Y., de Oliveira Rocha, B., de Fatima Santos Paim de Oliveira, M., Follador, I., Souza, E.S., Oliveira, P.D., and Rêgo, V.R.P.d.A. (2013). Inherited epidermolysis bullosa: Clinical and therapeutic aspects. *Brasilian Annals of Dermatology* 88, 185-198.
49. Cho, J.W., Ryu, H.W., Kim, S.A., Nakano, H., and Lee, K.S. (2014). Weber-Cockayne Type Epidermolysis Bullosa Simplex Resulting from a Novel Mutation (c. 608T>C) in the Keratin 5 Gene. *Annals of dermatology* 26, 739-742.
50. Kang, T.W., Lee, J.S., Kim, S.E., Oh, S.W., and Kim, S.C. (2010). Novel and recurrent mutations in Keratin 5 and 14 in Korean patients with Epidermolysis bullosa simplex. *Journal of dermatological science* 57, 90-94.
51. Sawant, M., Schwarz, N., Windoffer, R., Magin, T.M., Krieger, J., Mucke, N., Obara, B., Jankowski, V., Jankowski, J., Wally, V., et al. (2018). Threonine 150 Phosphorylation of Keratin 5 Is Linked to Epidermolysis Bullosa Simplex and Regulates Filament Assembly and Cell Viability. *Journal of Investigative Dermatology* 138, 627-636.

52. He, Y., Maier, K., Leppert, J., Hausser, I., Schwieger-Briel, A., Weibel, L., Theiler, M., Kiritsi, D., Busch, H., Boerries, M., et al. (2016). Monoallelic Mutations in the Translation Initiation Codon of KLHL24 Cause Skin Fragility. *American Journal of Human Genetics* 99, 1395-1404.
53. Lee, J.Y., Liu, L., Hsu, C.K., Aristodemou, S., Ozoemena, L., Ogboli, M., Moss, C., Martinez, A.E., Mellerio, J.E., and McGrath, J.A. (2017). Mutations in KLHL24 add to the molecular heterogeneity of epidermolysis bullosa simplex. *Journal of Investigative Dermatology*.
54. Mitsuhashi, Y., and Hashimoto, I. (2003). Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa. *Archives of dermatological research* 295 Suppl 1, 29-33.
55. Uitto, J., Bruckner-Tuderman, L., McGrath, J.A., Riedl, R., and Robinson, C. (2018). EB2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. *Journal of Investigative Dermatology* 138, 1010-1016.
56. Szeverenyi, I., Cassidy, A.J., Chung, C.W., Lee, B.T., Common, J.E., Ogg, S.C., Chen, H., Sim, S.Y., Goh, W.L., Ng, K.W., et al. (2008). The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human Mutation* 29, 351-360.
57. Fine, J.D., and Hintner, H. (2009). *Life with Epidermolysis Bullosa*. (Australia: Springer).
58. Bowden, P.E., Knight, A.G., and Liovic, M. (2009). A novel mutation (p.Thr198Ser) in the 1A helix of keratin 5 causes the localized variant of epidermolysis bullosa simplex. *Experimental dermatology* 18, 650-652.
59. Chan, Y., Yu, Q., LeBlanc-Straceski, J., Christiano, A., Pulkkinen, L., Kulchrdlapati, R., Uitto, J., and Fuchs, E. (1994). Mutations in the non-helical linker segment L1-2 of keratin 5 in patients with Weber-Cockayne epidermolysis bullosa simplex. *Journal of Cell Sciences* 107, 765-774.
60. Chamcheu, J.C., Siddiqui, I.A., Syed, D.N., Adhami, V.M., Liovic, M., and Mukhtar, H. (2011). Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Archives Biochemical Biophysics* 508, 123-137.
61. Coulombe, P.A., Hutton, E., Vassar, R., and Fusch, E. (1991). A function for keratin and commun thread among different types of epidermolysis bullosa simpex diseases. *Journal of Cell Biology* 115, 1661-1674.
62. Bchetnia, M., Farez, T., Lacroix, J., Leclerc, G., Powell, J., McCuaig, C., Legendre-Guillemain, V., Duperee, A., Morin, C., and Laprise, C. (2013). Gene expression analysis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Journal of Dermatological Sciences* 69, 80-82.
63. Andres, C., Chen, W., Hofmann, H., Ring, J., and Schnopp, C. (2009). Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation: A case report. *International journal of dermatology* 48, 753-754.
64. Uttam, J., Hutton, E., Coulombe, P.A., Anton-lamprecht, I., Yu, Q.-C., Gedde-Dahl, T., Fine, J.D., and Fusch, E. (1996). The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Science* 93, 9079-9084.
65. Harel, A., Bergman, R., Indelman, M., and Sprecher, E. (2006). Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation resulting from a recurrent mutation in KRT14. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 1654-1657.

66. Gu, L.H., Kim, S.C., Ichiki, Y., Park, J., Nagai, M., and Kitajima, Y. (2003). A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 482-485.
67. Sprecher, E., Yosipovitch, G., Bergman, R., Ciubutaro, D., Indelman, M., Pfendner, E., Goh, L.C., Miller, C.J., Uitto, J., and Richard, G. (2003). Epidermolytic hyperkeratosis and epidermolysis bullosa simplex caused by frameshift mutations altering the V2 tail domains of keratin 1 and keratin 5. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 623-626.
68. Horiguchi, Y., Sawamura, D., Mori, R., Nakamura, H., Takahashi, K., and Shimizu, H. (2005). Clinical heterogeneity of 1649delG mutation in the tail domain of keratin 5: A Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology* 125, 83-85.
69. Argyropoulou, Z., Liu, L., Ozoemena, L., Branco, C.C., Senra, R., Reis-Rego, A., and Mota-Vieira, L. (2018). A novel PLEC nonsense homozygous mutation (c.7159G > T; p.Glu2387\*) causes epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy and diffuse alopecia: a case report. *BMC Dermatology* 18, 1.
70. Natsuga, K., Nishie, W., Akiyama, M., Nakamura, H., Shinkuma, S., McMillan, J.R., Nagasaki, A., Has, C., Ouchi, T., Ishiko, A., et al. (2010). Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex. *Human Mutation* 31, 308-316.
71. Kyrova, J., Kopeckova, L., Buckova, H., Mrazova, L., Vesely, K., Hermanova, M., Oslejskova, H., and Fajkusova, L. (2016). Epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. Review of the literature and a case report. *Journal of Dermatological Case Reports* 10, 39-48.
72. Pfendner, E., and Uitto, J. (2005). Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Journal of Investigative Dermatology* 124, 111-115.
73. Natsuga, K. (2015). Plectin-related skin diseases. *Journal of dermatological science* 77, 139-145.
74. Petek, L.M., Fleckman, P., and Miller, D.G. (2010). Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex. *Molecular Therapy* 18, 1624-1632.
75. Chiaverini, C., Fontas, E., Vabres, P., Bessis, D., Mazereeuw, J., Charlesworth, A., Meneguzzi, G., and Lacour, J.P. (2015). Oral erythromycin therapy in epidermolysis bullosa simplex generalized severe. *British Journal of Dermatology* 173, 563-564.
76. Pai, S., and Marinkovich, M.P. (2002). Epidermolysis Bullosa: New and emerging trends. *American Journal of Dermatology* 3, 371-380.
77. Chamcheu, J.C., Navsaria, H., Pihl-Lundin, I., Liovic, M., Vahlquist, A., and Torma, H. (2011). Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 1684-1691.
78. Aushev, M., Koller, U., Mussolino, C., Cathomen, T., and Reichelt, J. (2017). Traceless Targeting and Isolation of Gene-Edited Immortalized Keratinocytes from Epidermolysis Bullosa Simplex Patients. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development* 6, 112-123.
79. Kocher, T., Peking, P., Klausegger, A., Murauer, E.M., Hofbauer, J.P., Wally, V., Lettner, T., Hainzl, S., Ablinger, M., Bauer, J.W., et al. (2017). Cut and Paste: Efficient



- Homology-Directed Repair of a Dominant Negative KRT14 Mutation via CRISPR/Cas9 Nickases. *Molecular Therapy* 25, 2585-2598.
80. Bchetnia, M., Tremblay, M.L., Leclerc, G., Duperee, A., Powell, J., McCuaig, C., Morin, C., Legendre-Guillemain, V., and Laprise, C. (2012). Expression signature of epidermolysis bullosa simplex. *Human Genetic* 131, 393-406.
  81. Rugg, E.L., Horn, H.M., Smith, F.J., Wilson, N.J., Hill, A.J., Magee, G.J., Shemanko, C.S., Baty, D.U., Tidman, M.J., and Lane, E.B. (2007). Epidermolysis bullosa simplex in Scotland caused by a spectrum of keratin mutations. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 574-580.
  82. Oh, S.W., Lee, J.S., Kim, M.Y., and Kim, S.C. (2007). Novel keratin 5 mutations in epidermolysis bullosa simplex: cases with unusual genotype-phenotype correlation. *Journal of dermatological science* 48, 229-232.
  83. Bolling, M.C., Lemmink, H.H., Jansen, G.H., and Jonkman, M.F. (2011). Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *British Journal of Dermatology* 164, 637-644.
  84. Khordadpoor-Deilamani, F., Taghi Akbari, M., Karimipoor, M., and Javadi, G. (2015). Sequence analysis of tyrosinase gene in ocular and oculocutaneous albinism patients: introducing three novel mutations. *Molecular Vision* 21, 730-735.
  85. Bchetnia, M., Lacroix, J., Farez, T., Larouche, M., Powell, J., McCuaig, C., Dupere, A., Morin, C., Legendre-Guillemain, V., and Laprise, C. (2015). Reduction in keratin aggregates in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes after pretreatment with trimethylamine N-oxide. *Experimental dermatology* 25, 229-230.
  86. Bennion, B.J., and Daggett, V. (2004). Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Science* 101, 6433-6438.
  87. Werner, N.S., Windoffer, R., Strnad, P., Grund, C., Leube, R.E., and Magin, T.M. (2003). Epidermolysis Bullosa Simplex-Type Mutations Alter the Dynamics of the Keratin Cytoskeleton and Reveal a Contribution of Actin to the Transport of Keratin Subunits. *Molecular biology of the cell* 15, 990-1002.
  88. Pâques, F., and Duchateau, P. (2007). Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 7.
  89. Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096-1258091-1258096-1258099.
  90. Rebar, E.J., and Pabo, C.O. (1994). Zinc Finger Phage : Affinity Selection of Fingers with New DNA-Binding Specificities. *Science* 263, 671-673.
  91. Kim, H., and Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* 15, 321-334.
  92. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
  93. Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424.
  94. Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464-471.

95. Niu, J., Zhang, B., and Chen, H. (2014). Applications of TALENs and CRISPR/Cas9 in human cells and their potentials for gene therapy. *Molecular Biotechnology* 56, 681-688.
96. Chadwick, A.C., and Musunuru, K. (2017). Genome Editing for the Study of Cardiovascular Diseases. *Current Cardiology Reports* 19, 1-22.
97. Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., and Heffron, F. (1983). A Site-Specific Endonuclease Essential for Mating-Type Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 36, 167-174.
98. Jacquier, A., and Dujon, B. (1985). An Intron-Encoded Protein Is Active in a Gene Conversion Process That Spreads an Intron into a Mitochondrial Gene. *Cell* 41, 383-394.
99. Gurlevik, E., Schache, P., Goetz, A., Kloos, A., Woller, N., Armbrrecht, N., Manns, M.P., Kubicka, S., and Kuhnel, F. (2013). Meganuclease-mediated virus self-cleavage facilitates tumor-specific virus replication. *Molecular Therapy* 21, 1738-1748.
100. Epinat, J.C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., Patin, A., Zanghellini, A., Pâques, F., and Lacroix, E. (2003). A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 31, 2952-2962.
101. Thierry, A., and Dujon, B. (1992). Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce 1: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* 20, 5625-5631.
102. Rong, Y.S. (2000). Gene Targeting by Homologous Recombination in *Drosophila*. *Science* 288, 2013-2018.
103. Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acid Research* 21, 5034-5040.
104. Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., and Pâques, F. (2011). Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 11-27.
105. Yu, L., Batara, J., and Lu, B. (2016). Application of Genome Editing Technology to MicroRNA Research in Mammals. In: *M.T.f.G. Engineering*, ed. (InTech).
106. Porteus, M.H. (2015). Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome biology* 16, 286-298.
107. Stoddard, B.L. (2005). Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys* 38, 49-95.
108. Grosse, S., Huot, N., Mahiet, C., Arnould, S., Barradeau, S., Clerre, D.L., Chion-Sotinel, I., Jacqmarcq, C., Chapellier, B., Ergani, A., et al. (2011). Meganuclease-mediated Inhibition of HSV1 Infection in Cultured Cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 694-702.
109. Izmiryan, A., Danos, O., and Hovnanian, A. (2016). Meganuclease-Mediated COL7A1 Gene Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* 136, 872-875.
110. Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991). Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817.
111. Lee, J., Chung, J.H., Kim, H.M., Kim, D.W., and Kim, H. (2016). Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* 14, 448-462.

112. Carroll, D. (2011). Zinc-Finger Nucleases: A Panoramic View. *Current Gene Therapy* 11, 2-10.
113. Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K. (1998). Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Science* 95, 10564-10569.
114. LaFountaine, J.S., Fathe, K., and Smyth, H.D. (2015). Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *International journal of pharmaceutics* 494, 180-194.
115. Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K., and Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Science* 95, 10570-10575.
116. Collin, J., and Lako, M. (2011). Concise review: putting a finger on stem cell biology: zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29, 1021-1033.
117. Gupta, S.K., and Shukla, P. (2016). Gene editing for cell engineering: trends and applications. *Critical Review in Biotechnology*, 1-13.
118. Langner, T., Kamoun, S., and Belhaj, K. (2018). CRISPR Crops: Plant Genome Editing Toward Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 56, 22.21-22.34.
119. Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., et al. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature biotechnology* 25, 1298-1306.
120. Zou, J., Maeder, M.L., Mali, P., Pruetz-Miller, S.M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.K., Chen, G., Ye, Z., Park, I.H., Daley, G.Q., et al. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell stem cell* 5, 97-110.
121. Höher, T., Wallace, L., Khan, K., Cathomen, T., and Reichelt, J. (2012). Highly efficient zinc-finger nuclease-mediated disruption of an eGFP transgene in keratinocyte stem cells without impairment of stem cell properties. *Stem Cell Review* 8, 426-434.
122. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512.
123. Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 49-55.
124. Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843-1846.
125. Wright, D.A., Li, T., Yang, B., and Spalding, M.H. (2014). TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochemical Journal* 462, 15-24.
126. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757-761.
127. Shinkuma, S., Guo, Z., and Christiano, A.M. (2016). Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 5676-5681.
128. Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015). Precise correction of the

- dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports* 4, 143-154.
129. Tremblay, J.P. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences* 31, 1014-1022.
  130. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology* 169, 5429-5433.
  131. Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., et al. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology* 9, 467-477.
  132. Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct* 6, 38-65.
  133. Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170.
  134. Eid, A., Alshareef, S., and Mahfouz, M.M. (2018). CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. *Biochemical Journal* 475, 1955-1964.
  135. Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology* 31, 230-232.
  136. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science Magazine*, 1-7.
  137. Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics* 45, 273-497.
  138. Marraffini, L.A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526, 55-61.
  139. Christin, J.R., and Beckert, M.V. (2016). Origins and Applications of CRISPR-Mediated Genome Editing. *Einstein Journal of Biology and Medicine* 31, 2-5.
  140. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281-2308.
  141. Kruminis-Kaszkiel, E., Juranek, J., Maksymowicz, W., and Wojtkiewicz, J. (2018). CRISPR/Cas9 Technology as an Emerging Tool for Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *International journal of molecular sciences* 19.
  142. Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173-1183.
  143. Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., et al. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451.
  144. Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., and Joung, J.K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature methods* 10, 977-979.

145. Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Franklin, B., Kellner, M.J., Joung, J., and Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358, 1019-1027.
146. Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J.J., Verdine, V., Cox, D.B.T., Kellner, M.J., Regev, A., et al. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550, 280-284.
147. Kim, D., Lim, K., Kim, S.T., Yoon, S.H., Kim, K., Ryu, S.M., and Kim, J.S. (2017). Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nature biotechnology* 35, 475-480.
148. Kim, Y.B., Komor, A.C., Levy, J.M., Packer, M.S., Zhao, K.T., and Liu, D.R. (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature biotechnology* 35, 371-376.
149. Komor, A.C., Zhao, K.T., Packer, M.S., Gaudelli, N.M., Waterbury, A.L., Koblan, L.W., Kim, Y.B., Badran, A.H., and Liu, D.R. (2017). Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances* 3, 1-9.
150. Mohanta, T.K., Bashir, T., Hashem, A., Abd Allah, E.F., and Bae, H. (2017). Genome Editing Tools in Plants. *Genes* 8, 1-24.
151. O'Connell, M. (2018). Molecular Mechanisms of RNA-Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *Journal of Molecular Biology*.
152. Rojo, F.P., Nyman, R.K.M., Johnson, A.A.T., Navarro, M.P., Ryan, M.H., Erskine, W., and Kaur, P. (2018). CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered* 9, 214-221.
153. Tambe, A., East-Seletsky, A., Knott, G.J., Doudna, J.A., and O'Connell, M.R. (2018). RNA Binding and HEPN-Nuclease Activation Are Decoupled in CRISPR-Cas13a. *Cell Reports* 24, 1025-1036.
154. Matsoukas, I.G. (2018). Commentary: RNA editing with CRISPR-Cas13. *Frontiers in Genetics* 9, 1-4.
155. Hainzl, S., Peking, P., Kocher, T., Murauer, E.M., Larcher, F., Del Rio, M., Duarte, B., Steiner, M., Klausegger, A., Bauer, J.W., et al. (2017). COL7A1 Editing via CRISPR/Cas9 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Molecular Therapy* 25, 30319-30322.
156. Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Castellanos Rivera, R.M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403-407.
157. Duan, D. (2017). A New Kid on the Playground of CRISPR DMD Therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev* 28, 62-64.
158. Gee, P., Xu, H., and Hotta, A. (2017). Cellular Reprogramming, Genome Editing, and Alternative CRISPR Cas9 Technologies for Precise Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cells Int* 2017, 8765154.
159. Nowak, K.J., and Davies, K.E. (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Reports* 5, 872-876.
160. Tremblay, J.P., Iyombe, J.-P., Duchêne, B., and Ouellet, D.L. (2016). Gene Editing for Duchenne Muscular Dystrophy Using the CRISPR/Cas9 Technology: The Importance of Fine-tuning the Approach. *Molecular Therapy* 24, 1888-1889.
161. Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H.E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., et al. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates

- neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *Journal of Clinical Investigation* 127, 2719-2724.
162. Heidenreich, M., and Zhang, F. (2016). Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nature Review Neuroscience* 17, 36-44.
  163. Rohn, T.T., Kim, N., Isho, N.F., and Mack, J.M. (2018). The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease and Parkinsonism* 8, 439.
  164. Vannocci, T., Faggianelli, N., Zaccagnino, S., della Rosa, I., Adinolfi, S., and Pastore, A. (2015). A new cellular model to follow Friedreich's ataxia development in a time-resolved way. *Disease Model and Mechanisms* 8, 711-735.
  165. Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological Toxicological Methods* 51, 187-200.
  166. Sprecher, E. (2010). Epidermolysis bullosa simplex. In *Dermatologic clinics*. (United States), pp 23-32.
  167. Bolling, M.C., Lemmink, H.H., Jansen, G.H., and Jonkman, M.F. (2011). Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *The British journal of dermatology* 164, 637-644.
  168. Letai, A., Coulombe, P.A., McCormick, M.B., Yu, Q.C., Hutton, E., and Fuchs, E. (1993). Disease severity correlates with position of keratin point mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3197-3201.
  169. Sorensen, C.B., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Andresen, B.S., Brandrup, F., Veien, N.K., Buus, S.K., Anton-Lamprecht, I., Kruse, T.A., Jensen, P.K., Eiberg, H., et al. (1999). Identification of novel and known mutations in the genes for keratin 5 and 14 in Danish patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. In *The Journal of investigative dermatology*. (United States), pp 184-190.
  170. Chamcheu, J.C., Siddiqui, I.A., Syed, D.N., Adhami, V.M., Liovic, M., and Mukhtar, H. (2011). Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. In *Arch Biochem Biophys*. (United States), pp 123-137.
  171. Coulombe, P.A., Kerns, M.L., and Fuchs, E. (2009). Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *The Journal of clinical investigation* 119, 1784-1793.
  172. Uitto, J., Bruckner-Tuderman, L., McGrath, J.A., Riedl, R., and Robinson, C. (2018). EB2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. *The Journal of investigative dermatology* 138, 1010-1016.
  173. Wally, V., Lettner, T., Peking, P., Peckl-Schmid, D., Murauer, E.M., Hainzl, S., Hintner, H., and Bauer, J.W. (2013). The pathogenetic role of IL-1beta in severe epidermolysis bullosa simplex. In *The Journal of investigative dermatology*. (United States), pp 1901-1903.
  174. Wally, V., Hovnanian, A., Ly, J., Buckova, H., Brunner, V., Lettner, T., Ablinger, M., Felder, T.K., Hofbauer, P., Wolkersdorfer, M., et al. (2018). Diacerein orphan drug development for epidermolysis bullosa simplex: A phase 2/3 randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology* 78, 892-901 e897.

175. Chamcheu, J.C., Lorie, E.P., Akgul, B., Bannbers, E., Virtanen, M., Gammon, L., Moustakas, A., Navsaria, H., Vahlquist, A., and Torma, H. (2009). Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. In *Journal of dermatological science*. (Netherlands), pp 198-206.
176. Bchetnia, M., Lacroix, J., Farez, T., Larouche, M., Powell, J., McCuaig, C., Dupere, A., Morin, C., Legendre-Guillemain, V., and Laprise, C. (2016). Reduction in keratin aggregates in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes after pretreatment with trimethylamine N-oxide. *Experimental dermatology* 25, 229-230.
177. Aushev, M., Koller, U., Mussolino, C., Cathomen, T., and Reichelt, J. (2017). Traceless Targeting and Isolation of Gene-Edited Immortalized Keratinocytes from Epidermolysis Bullosa Simplex Patients. In *Mol Ther Methods Clin Dev*. (United States), pp 112-123.
178. Peking, P., Breitenbach, J.S., Ablinger, M., Muss, W.H., Poetschke, F.J., Kocher, T., Koller, U., Hainzl, S., Kitzmueller, S., Bauer, J.W., et al. (2018). An ex-vivo RNA trans-splicing strategy to correct human generalized severe epidermolysis bullosa simplex. *The British journal of dermatology*.
179. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In *Science*. (United States), pp 816-821.
180. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281-2308.
181. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. In *Science*. (United States), pp 823-826.
182. March, O.P., Reichelt, J., and Koller, U. (2018). Gene editing for skin diseases: designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders. *Experimental physiology* 103, 449-455.
183. Kocher, T., Peking, P., Klausegger, A., Murauer, E.M., Hofbauer, J.P., Wally, V., Lettner, T., Hainzl, S., Ablinger, M., Bauer, J.W., et al. (2017). Cut and Paste: Efficient Homology-Directed Repair of a Dominant Negative KRT14 Mutation via CRISPR/Cas9 Nickases. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25, 2585-2598.
184. Richardson, C.D., Ray, G.J., DeWitt, M.A., Curie, G.L., and Corn, J.E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature biotechnology* 34, 339-344.
185. Webber, B.R., Osborn, M.J., McElroy, A.N., Twaroski, K., Lonetree, C.L., DeFeo, A.P., Xia, L., Eide, C., Lees, C.J., McElmurry, R.T., et al. (2016). CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *NPJ Regenerative medicine* 1.
186. Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. In *Brief Bioinform*. (England), pp 178-192.
187. Firth, A.L., Menon, T., Parker, G.S., Qualls, S.J., Lewis, B.M., Ke, E., Dargitz, C.T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F.H., et al. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports* 12, 1385-1390.

188. Xie, F., Ye, L., Chang, J.C., Beyer, A.I., Wang, J., Muench, M.O., and Kan, Y.W. (2014). Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. In *Genome Res.* (United States), pp 1526-1533.
189. Prakash, V., Moore, M., and Yanez-Munoz, R.J. (2016). Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. In *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* (United States), pp 465-474.
190. Song, B., Fan, Y., He, W., Zhu, D., Niu, X., Wang, D., Ou, Z., Luo, M., and Sun, X. (2015). Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem cells and development* 24, 1053-1065.
191. Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345, 1184-1188.
192. Flynn, R., Grundmann, A., Renz, P., Hanseler, W., James, W.S., Cowley, S.A., and Moore, M.D. (2015). CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Experimental hematology* 43, 838-848 e833.
193. Chang, C.W., Lai, Y.S., Westin, E., Khodadadi-Jamayran, A., Pawlik, K.M., Lamb, L.S., Jr., Goldman, F.D., and Townes, T.M. (2015). Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell reports* 12, 1668-1677.
194. Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R.L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P.A., Jacks, T., and Anderson, D.G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. In *Nat Biotechnol.* (United States), pp 551-553.
195. Yang, Y., Wang, L., Bell, P., McMenamin, D., He, Z., White, J., Yu, H., Xu, C., Morizono, H., Musunuru, K., et al. (2016). A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. In *Nat Biotechnol.* (United States), pp 334-338.
196. Bassuk, A.G., Zheng, A., Li, Y., Tsang, S.H., and Mahajan, V.B. (2016). Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. In *Sci Rep.* (England), p 19969.
197. Men, K., Duan, X., He, Z., Yang, Y., Yao, S., and Wei, Y. (2017). CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. In *Sci China Life Sci.* (China), pp 447-457.
198. Hustedt, N., and Durocher, D. (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. In *Nat Cell Biol.* (England), pp 1-9.
199. Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. In *Nat Rev Cancer.* (England), pp 93-115.
200. Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163, 759-771.
201. Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., and Ploegh, H.L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9



- by inhibition of nonhomologous end joining. In *Nat Biotechnol.* (United States), pp 538-542.
202. Song, J., Yang, D., Xu, J., Zhu, T., Chen, Y.E., and Zhang, J. (2016). RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. In *Nat Commun.* (England), p 10548.
  203. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., and Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. In *Nat Med.* (United States), pp 927-930.
  204. Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In *Nature.* (England), pp 490-495.
  205. Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. In *Nat Biotechnol.* (United States), pp 822-826.
  206. Hainzl, S., Peking, P., Kocher, T., Murauer, E.M., Larcher, F., Del Rio, M., Duarte, B., Steiner, M., Klausegger, A., Bauer, J.W., et al. (2017). COL7A1 Editing via CRISPR/Cas9 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Molecular Therapy* 25, 2573-2584.
  207. Benati, D., Miselli, F., Cocchiarella, F., Patrizi, C., Carretero, M., Baldassarri, S., Ammendola, V., Has, C., Colloca, S., Del Rio, M., et al. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated In Situ Correction of LAMB3 Gene in Keratinocytes Derived from a Junctional Epidermolysis Bullosa Patient. *Molecular Therapy* 26, 2592-2603.
  208. Bachu, R., Bergareche, I., and Chasin, L.A. (2015). CRISPR-Cas targeted plasmid integration into mammalian cells via non-homologous end joining. *Biotechnology and bioengineering* 112, 2154-2162.
  209. Takashima, S., Shinkuma, S., Fujita, Y., Nomura, T., Ujiie, H., Natsuga, K., Iwata, H., Nakamura, H., Vorobyev, A., Abe, R., et al. (2019). Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9. *Journal of Investigative Dermatology.*
  210. Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., and Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533, 125-129.
  211. Bialk, P., Rivera-Torres, N., Strouse, B., and Kmiec, E.B. (2015). Regulation of Gene Editing Activity Directed by Single-Stranded Oligonucleotides and CRISPR/Cas9 Systems. *PloS one* 10, e0129308.
  212. Gresch, O., and Altrogge, L. (2012). Transfection of Difficult-to-Transfect Primary Mammalian Cells. In *Methods in Molecular Biology*, J.L. Hartley, ed. (Humana Press), p 282.
  213. Chamcheu, J.C., Siddiqui, I.A., and Mukhtar, H. (2016). Chemical Chaperone therapy, a new strategy for genetic skin fragility disorders. *Experimental dermatology* 25, 183-184.
  214. The National Academies of Sciences Engineering Medicine. (2017). *Human Genome Editing: Science, Ethics and Governance.*(Washington (DC)).
  215. Bosley, K.S., Botchan, M., Bredenoord, A.L., Carroll, D., Charo, R.A., Charpentier, E., Cohen, R., Corn, J., Doudna, J., Feng, G., et al. (2015). CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nature biotechnology* 33, 478-486.

216. Brokowski, C., and Adli, M. (2018). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*.
217. Javed, M.R., Sadaf, M., Ahmed, T., Jamil, A., Nawaz, M., Abbas, H., and Ijaz, A. (2018). CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms. *Current Microbiology*, 1-9.
218. Conseil de recherche en sciences humaines du Canada, Conseil de recherche en science naturelles et en génie du Canada, and Canada, I.d.r.e.s.d. (2014). Énoncé de politique des Trois Conseils: Éthique de la recherche avec des êtres humains. In. (Canada), pp 1-242.
219. Knoppers, B.M., Isasi, R., Caulfield, T., Kleiderman, E., Bedford, P., Illes, J., Ogbogu, U., Ravitsky, V., and Rudnicki, M. (2017). Human gene editing: revisiting Canadian policy. *npj Regenerative Medicine* 2, 1-2.
220. Gouvernement du Canada. (2018). Loi sur la procréation assistée. In. (Canada, Ministère de la Justice du Canada), pp 1-28.
221. Food and Drugs Administration. (2016). Gene Editing: CBER's Perspective. In., pp 1-13.
222. Ishii, T. (2015). Germline genome-editing research and its socioethical implications. *Trends Mol Med* 21, 473-481.
223. Ormond, K.E., Mortlock, D.P., Scholes, D.T., Bombard, Y., Brody, L.C., Faucett, W.A., Garrison, N.A., Hercher, L., Isasi, R., Middleton, A., et al. (2017). Human Germline Genome Editing. *American Journal of Human Genetics* 101, 167-176.
224. Nuffield Council on Bioethics. (2016). Genome editing. In. (London, Nuffield Council on Bioethics,.